

# **Guide des analyses en immunologie**

**Indications, critères de réalisation et limites**

## *Chez le même éditeur*

---

### *Du même auteur :*

Méthodes en immunologie : des principes à la bonne application, 192 pages, à paraître.

Immunologie fondamentale et immunopathologie. Enseignements thématique et intégré - Tissu lymphoïde et sanguin / Immunopathologie et immuno-intervention, 280 pages, 2013.

### *Autres ouvrages :*

Bactériologie médicale, 2<sup>e</sup> édition, par François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin, 640 pages, 2011.

Gaz du sang facile, par Iain A M Hennessey, Alan G Japp, Éric Raynaud de Mauverger, 152 pages, 2010.

Le bilan biochimique facile, Jeremy Hughes, Ashley Jefferson, Éric Raynaud de Mauverger, 248 pages, 2009.

Guide thérapeutique 2014, 7<sup>e</sup> édition, par Léon Perlemuter et Gabriel Perlemuter, 2 368 pages, à paraître.

Dictionnaire médical, 6<sup>e</sup> édition, version électronique et atlas anatomique inclus, par Jacques Quevauvilliers, 1 608 pages, 2009.

# **Guide des analyses en immunologie**

## **Indications, critères de réalisation et limites**

**Assim, Collège des Enseignants d'Immunologie  
SFI, Société Française d'Immunologie**

*Coordonné par :*

**Myriam Labalette**

PU-PH, CHU de Lille, faculté de médecine, université Lille 2

**Marie Christine Béné**

PU-PH, CHU de Nantes, faculté de médecine, université de Nantes



**ELSEVIER  
MASSON**



Ce logo a pour objet d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, tout particulièrement dans le domaine universitaire, le développement massif du « photocopillage ». Cette pratique qui s'est généralisée, notamment dans les établissements d'enseignement, provoque une baisse brutale des achats de livres, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.

Nous rappelons donc que la reproduction et la vente sans autorisation, ainsi que le recel, sont passibles de poursuites. Les demandes d'autorisation de photocopier doivent être adressées à l'éditeur ou au Centre français d'exploitation du droit de copie : 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris.

Tél. 01 44 07 47 70.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés, réservés pour tous pays. Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective et, d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle).

© 2014, Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

ISBN print : 978-2-294-74025-1

ISBN numérique : 978-2-294-74160-9

Elsevier Masson SAS, 62, rue Camille-Desmoulins, 92442 Issy-les-Moulineaux CEDEX

[www.elsevier-masson.fr](http://www.elsevier-masson.fr)

# Liste des collaborateurs

*Document réalisé sous l'égide de la SFI, Société Française d'Immunologie, et de l'Assim, Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie, avec le soutien de :*

**Estelle Seillès**, Présidente de l'Assim, CHU de Besançon et université de Franche-Comté.

**François Lemoine**, Président du CNU d'immunologie (section 47-03), faculté de médecine Pierre-et-Marie-Curie, groupe hospitalier La Pitié-Salpêtrière, Paris.

*L'ensemble de l'ouvrage a été coordonné par :*

**Myriam Labalette**, PU-PH en immunologie, CHU de Lille et faculté de médecine, université Lille 2.

**Marie Christine Béné**

PU-PH en hématologie, CHU de Nantes et faculté de médecine, université de Nantes.

*La rédaction de chaque partie a été pilotée par un ou plusieurs coordonnateurs et sa rédaction réalisée par un groupe d'auteurs.*

## Partie 1 – Exploration de l'allergie

*Coordonnateurs :* Joana Vitte et Pascale Nicaise

*Auteurs :*

**Pol-André Aupoil**, CHU de Toulouse, hôpital de Rangueil et faculté de médecine, université Paul-Sabatier Toulouse III.

**Séverine Brabant**, CHU de Lille.

**Sylvie Chollet-Martin**, hôpital Bichat, Paris et faculté de pharmacie-hôpital Paris-Sud.

**Rémy Couderc**, hôpital Trousseau, Paris.

**Sylvain Dubucquoi**, CHU de Lille et faculté de médecine, université Lille 2.

**Délia Jaby**, centre hospitalier de Saint-Denis.

**Claude Lambert**, CHU de Saint-Étienne.

**Dominique Laroche**, hôpital Clémenceau, CHU de Caen et faculté de médecine, université de Caen Basse-Normandie.

**Delphine Mariotte**, hôpital Clémenceau, CHU de Caen.

**Pascale Nicaise**, hôpital Bichat, Paris.

**Gilles Rénier**, CHU d'Angers.

**Paul Rouzaire**, CHU de Clermont-Ferrand.

**Jean Sainte-Laudy**, Limoges.

**Joana Vitte**, CHU de Marseille, hôpital de la Conception et faculté de médecine, université de la Méditerranée Aix-Marseille.

## Partie 2 – Exploration de l'auto-immunité

*Coordonnateur :* Chantal André et Sylvain Dubucquoi

*Auteurs :*

**Marie-Alexandra Alyanakian**, Hôpital Necker, Paris.

**Chantal André**, hôpital Henri-Mondor, Créteil et faculté de médecine UPEC.

**Anne Barra**, CHU de Poitiers.

**Joseph Boucraut**, CHU de Marseille, hôpital de la Conception et faculté de médecine, université de la Méditerranée Aix-Marseille.

**Sophie Candon**, hôpital Necker et faculté de médecine René-Descartes, Paris.

**Christiane Caudie**, CHU de Lyon.

**Alain Chevailler**, CHU d'Angers et faculté de médecine, université d'Angers.

**Sylvain Dubucquoi**, CHU de Lille et faculté de médecine, université Lille 2.

**Michèle d'Herbomez**, CHU de Lille et faculté de médecine, université Lille 2.

**Nicole Fabien**, CHU de Lyon.

**Catherine Johanet**, hôpital Saint-Antoine et faculté de médecine Pierre-et-Marie-Curie, Paris.

**Fabienne Jouen**, CHU de Rouen.

**Christine Massart**, CHU de Rennes Pontchaillou et faculté de médecine, université de Rennes 1.

**Sabine Mignot**, hôpital Bichat, Paris.

**Makoto Miyara**, groupe hospitalier La Pitié-Salpêtrière, Paris.

### Partie 3 – Exploration de l'immunité humorale

*Coordonnateur* : Marie-Agnès Dragon-Durey

*Auteurs* :

**Marie-Alexandra Alyanakian**, hôpital Necker, Paris.

**Pierre Aucouturier**, hôpital Tenon et faculté de médecine Pierre-et-Marie-Curie, Paris.

**Frédéric Batteux**, hôpital Cochin et faculté de médecine, université René-Descartes, Paris.

**Jean-Yves Cesbron**, CHU de Grenoble et faculté de médecine, université Joseph-Fourier.

**Danielle Degenne**, CHU de Tours.

**Marie-Agnès Dragon-Durey**, hôpital européen Georges-Pompidou et faculté de médecine, université René-Descartes, Paris.

**Christian Drouet**, CHU de Grenoble et faculté de pharmacie, université Joseph-Fourier.

**Véronique Frémeaux-Bacchi**, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris.

**Valérie Frenkel**, hôpital Henri-Mondor, Créteil et faculté de médecine UPEC.

**Pascale Ghillani-Dalbin**, groupe hospitalier La Pitié-Salpêtrière, Paris.

**Lucile Musset**, groupe hospitalier La Pitié-Salpêtrière, Paris.

**Capucine Picard**, hôpital Necker et faculté de médecine René-Descartes, Paris.

**Bénédicte Puissant**, CHU de Toulouse, hôpital de Rangueil et faculté de médecine, université Paul-Sabatier Toulouse III.

**Marie-Nathalie Sarda**, hospices civils de Lyon et faculté de médecine, université Claude-Bernard Lyon 2.

**Arlette Tridon**, CHU de Clermont-Ferrand et faculté de médecine, université d'Auvergne.

**Estelle Seillès**, CHU de Besançon et facultés de médecine et de pharmacie, université de Franche-Comté.

**Ghislaine Sterkers**, hôpital Robert-Debré et faculté de médecine, université Denis-Diderot, Paris.

### Partie 4 – Exploration de l'immunité cellulaire

*Coordonnateur* : Guislaine Carcelain

*Auteurs* :

**Sophie Candon**, hôpital Necker et faculté de médecine René-Descartes, Paris.

**Guislaine Carcelain**, groupe hospitalier La Pitié-Salpêtrière et faculté de médecine Pierre-et-Marie-Curie, Paris.

**Marcelo De Carvalho Bittencourt**, CHU de Nancy et faculté de médecine, université de Lorraine.

**Marie-Anne Gougerot-Pocidalò**, hôpital Bichat et faculté de médecine Denis-Diderot, Paris.

**Myriam Labalette**, CHU de Lille et faculté de médecine, université Lille 2.

**Sabine Le Gouvello**, hôpital Henri-Mondor, Créteil et faculté de médecine UPEC.

**Margarita Nedelec**, hôpital Bichat et faculté de médecine Denis-Diderot, Paris.

**Capucine Picard**, hôpital Necker et faculté de médecine René-Descartes, Paris.

**Ghislaine Sterkers**, hôpital Robert-Debré et faculté de médecine, université Denis-Diderot, Paris.

**Éric Tartour**, hôpital européen Georges-Pompidou et faculté de médecine, université René-Descartes, Paris.

## Partie 5 – Exploration en histocompatibilité, études des associations HLA-maladies

*Coordonnateur* : Myriam Labalette

*Auteurs* :

**Sophie Caillat-Zuckman**, hôpital Robert-Debré et faculté de médecine, université Denis-Diderot, Paris.

**Valérie Dubois**, EFS de Lyon.

**Vincent Elsermans**, CHU de Lille.

**Myriam Labalette**, CHU de Lille et faculté de médecine, université Lille 2.

**Jean-Luc Taupin**, CHU de Bordeaux et faculté de médecine, université Bordeaux-Segalen.

## Partie 6 – Exploration des traitements par biomédicaments immunologiques

*Coordonnateur* : Patricia Amé-Thomas

*Auteurs* :

**Patricia Amé-Thomas**, CHU de Rennes Pontchaillou et faculté de médecine, université de Rennes 1.

**Catherine Massart**, CHU de Rennes Pontchaillou et faculté de médecine, université de Rennes 1.

**Sophie Candon**, hôpital Necker et faculté de médecine René-Descartes, Paris.

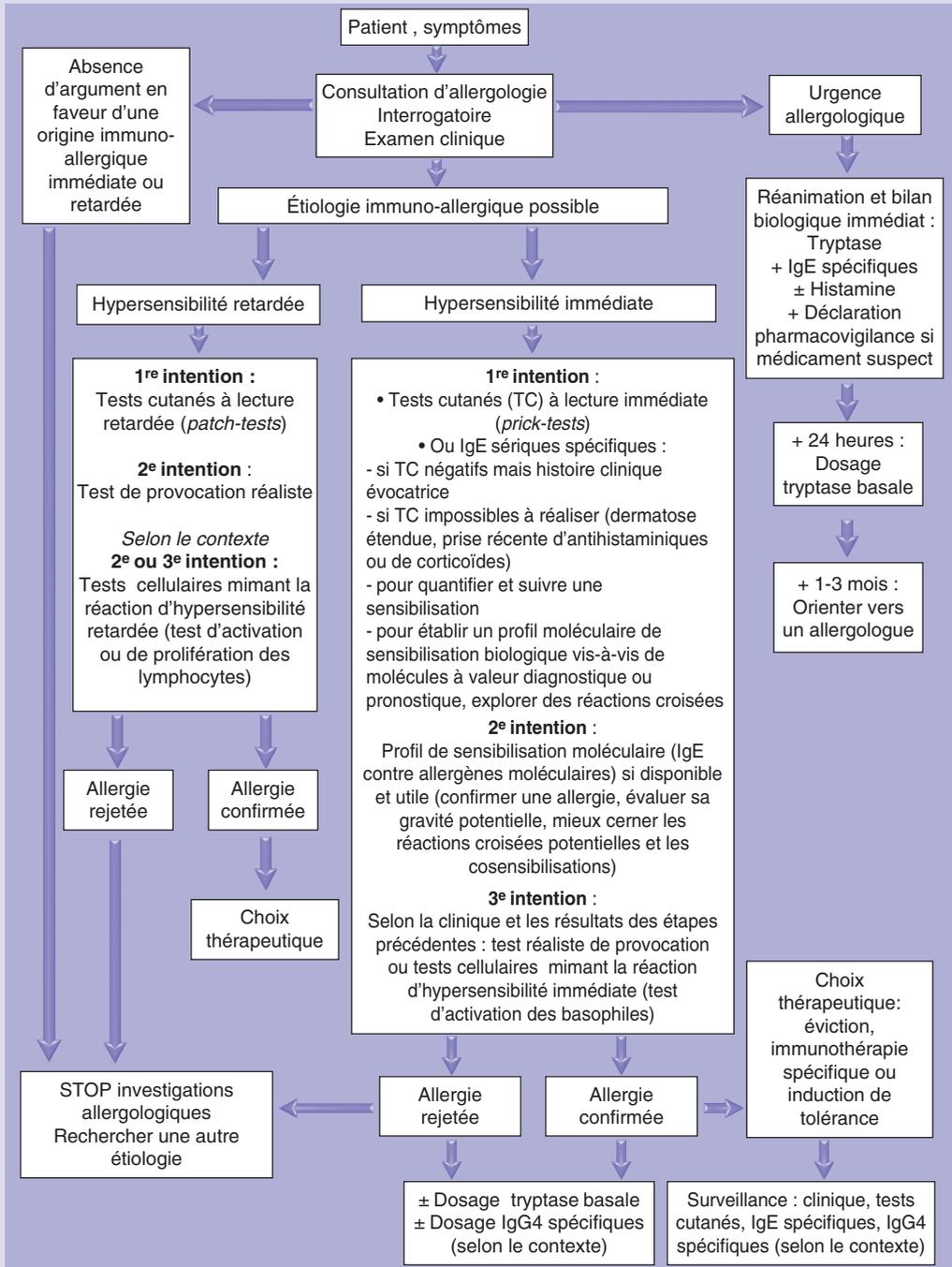
# Abréviations

<b>AAN</b>	Anticorps antinucléaires	<b>CaSR</b>	Récepteur sensible au calcium
<b>ACD</b>	Acide citrique-citrate-dextrose	<b>CBP</b>	Cirrhose biliaire primitive
<b>ACL</b>	Anticorps anti-cardiolipine	<b>CCP</b>	<i>Cyclic Citrullinated Peptides</i>
<b>ACPA</b>	<i>Anticitrullinated Protein Antibodies</i>	<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>ADA</b>	<i>Anti-Drug Antibodies</i>	<b>CDC</b>	Cytotoxicité dépendante du complément
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire	<b>CIQ</b>	Contrôle interne de qualité
<b>ADNdb</b>	ADN double brin (ADN natif)	<b>CLIA</b>	<i>Chemiluminescence Immunoassay</i>
<b>ADNsb</b>	ADN simple brin	<b>CLLM</b>	Chaînes légères libres monoclonales
<b>ALAT</b>	Alanine aminotransférase	<b>CMV</b>	Cytomégalovirus
<b>ALBIA</b>	<i>Addressable Laser Bead Immunoassay</i>	<b>CRP</b>	<i>C-Reactive Protein</i>
<b>ALPS</b>	<i>Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome</i>	<b>CSH</b>	Cellules souches hématopoïétiques
<b>AMA2</b>	Anticorps anti-mitochondries de type 2	<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>
<b>AMAN</b>	<i>Acute Motor Axonal Neuropathy</i>	<b>CV%</b>	Coefficient de variation
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate	<b>CYP</b>	Cytochrome P450
<b>AMPAR</b>	<i>Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazole Propionic Acid Receptor</i>	<b>DAF</b>	<i>Decay Accelerating Factor</i>
<b>AMPc</b>	AMP cyclique	<b>DBAI</b>	Dermatoses bulleuses auto-immunes
<b>AMSAN</b>	<i>Acute Motor Sensory Axonal Neuropathy</i>	<b>DICV</b>	Déficits immunitaires communs variables
<b>ANAES</b>	Agence nationale d'accréditation et des évaluations en santé	<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>ANCA</b>	<i>Anti-Neutrophil Cytoplasm Antibodies</i>	<b>DSA</b>	<i>Donor Specific Antigen</i>
<b>AP50</b>	<i>Alternate pathway 50 %</i>	<b>Dsg</b>	Desmogléine
<b>APL</b>	Anti-phospholipides	<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>ARACH</b>	Anti-récepteurs de l'acétylcholine	<b>EBV</b>	<i>Epstein-Barr Virus</i>
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique	<b>ECP</b>	<i>Eosinophil Cationic Protein</i>
<b>ARNt</b>	ARN de transfert	<b>EDTA</b>	Acide éthylène-diamino-tétraacétique
<b>ASAT</b>	Aspartate aminotransférase	<b>EdU</b>	5-éthynyl-2'-déoxyuridine
<b>ASCA</b>	<i>Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies</i>	<b>EEQ</b>	Évaluation externe de la qualité
<b>ASGPR</b>	<i>Asialoglycoprotein Receptor</i>	<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>BKV</b>	BK virus	<b>ELISPOT</b>	<i>Enzyme-Linked Immunospot</i>
<b>BOC</b>	Bandes oligoclonales	<b>EMG</b>	Électromyogramme
<b>BTK</b>	<i>Bruton's Tyrosine Kinase</i>	<b>ENA</b>	<i>Extractible Nuclear Antigens</i>
<b>CI1nh</b>	CI inhibiteur	<b>EPP</b>	Électrophorèse des protéines sériques
<b>C3Nef</b>	C3 <i>Nephritic factor</i>	<b>FB</b>	Facteur B
<b>CAM</b>	Complexe d'attaque membranaire	<b>FEIA</b>	<i>Fluorescent Enzyme ImmunoAssay</i>
<b>C-ANCA</b>	Fluorescence cytoplasmique des ANCA	<b>FH</b>	Facteur H
<b>CANOMAD</b>	<i>Chronic-Ataxic-Neuropathy-Ophthalmoplegia-Agglutination Disease</i>	<b>FI</b>	Facteur I ou Facteur intrinsèque (selon contexte)
		<b>FITC</b>	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
		<b>FLAER</b>	<i>Fluorescently-Labeled inactive variant of AERobysin</i>

<b>fMLP</b>	formyl-Met-Leu-Phe	<b>MCP</b>	<i>Membrane Cofactor Protein</i>
<b>FR</b>	Facteurs rhumatoïdes	<b>MCV</b>	<i>Mutated and Citrullinated Vimentin</i>
<b>FRO</b>	Formes réactives de l'oxygène	<b>MFI</b>	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
<b>GAD</b>	<i>Glutamate Acid Decarboxylase</i>	<b>MGUS</b>	<i>Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Significance</i>
<b>GEM</b>	Glomérulonéphrite extramembraneuse	<b>MICI</b>	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
<b>GEMi</b>	GEM idiopathique	<b>MLPA</b>	<i>Multiplex Ligand Probe Amplification</i>
<b>GEPA</b>	Granulomatose à éosinophiles avec polyangéite (syndrome de Churg et Strauss)	<b>MPA</b>	Micropolyangéite
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>	<b>MPO</b>	Myéloperoxydase
<b>GP</b>	Glycoprotéine	<b>MRP</b>	<i>Myeloid-Related Protein</i>
<b>GPA</b>	Granulomatose avec polyangéite (maladie de Wegener)	<b>MuSK</b>	Tyrosine kinase spécifique du muscle
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol	<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduite)
<b>HAI</b>	Hépatite auto-immune	<b>NANA</b>	<i>Nuclear-Associated Neutrophil Antibodies</i>
<b>HCSP</b>	Haut Conseil en Santé Publique	<b>NBT</b>	Test de réduction au nitrobleu de tétrazolium
<b>HEp-2</b>	<i>Human Epithelioma 2 cell line</i>	<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigens</i>	<b>NMBC</b>	Neuropathie périphérique motrice avec bloc de conduction
<b>HPN</b>	Hémoglobinurie paroxystique nocturne	<b>NMDA</b>	Acide N-méthyl-D-aspartique
<b>IA2</b>	<i>Insulinoma-Associated protein 2</i>	<b>NMO</b>	Neuromyérite optique
<b>ICA</b>	<i>Islet-Cell Antibodies</i>	<b>NOR90</b>	<i>Nuclear Organizer antigen</i>
<b>IDR</b>	Immunodiffusion radiale	<b>P-ANCA</b>	Fluorescence périmucléaire des ANCA
<b>IEF</b>	Isoélectrofocalisation	<b>PCNA</b>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
<b>IEP</b>	Immunoélectrophorèse	<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>IF</b>	Immunofixation	<b>PCR-SBT</b>	<i>PCR Sequence-Based Typing</i>
<b>IFI</b>	Immunofluorescence indirecte	<b>PCR-SSO</b>	<i>PCR using Sequence-Specific Oligonucleotides</i>
<b>IFN</b>	Interféron	<b>PCR-SSP</b>	<i>PCR using Sequence-Specific Primers</i>
<b>Ig</b>	Immunoglobuline	<b>PCT</b>	Procalcitonine
<b>IgA, IgE,</b>		<b>PEA</b>	Polyendocrinopathie auto-immune
<b>IgG...</b>	Immunoglobulines A, E, G...	<b>PHA</b>	Phytohémagglutinine
<b>IL</b>	Interleukine	<b>PLA2-R</b>	Récepteur de la phospholipase A2
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique	<b>PM/Scl</b>	<i>Polymyositis/Scleroderma</i>
<b>ITL</b>	Infection tuberculeuse latente	<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristate-13-acétate
<b>ITS</b>	Immunothérapie spécifique	<b>PML</b>	<i>Promyelocytic Leukemia</i>
<b>IV</b>	Intraveineuse	<b>PNN</b>	Polynucléaires neutrophiles
<b>LAD</b>	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i>	<b>PPP</b>	Plasma pauvre en plaquettes
<b>LADA</b>	<i>Latent Autoimmune Diabetes in Adult</i>	<b>PR</b>	Polyarthrite rhumatoïde
<b>LAMP</b>	<i>Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein</i>	<b>PR3</b>	Protéinase 3
<b>LBA</b>	Lavage bronchoalvéolaire	<b>PRA</b>	<i>Panel Reactive Antibody</i>
<b>LC</b>	<i>Liver Cytosol</i>	<b>PRI</b>	Protéines de la réaction inflammatoire
<b>LCR</b>	Liquide céphalorachidien	<b>PTPRN</b>	<i>Protein Tyrosine Phosphatase-Like N</i>
<b>LES</b>	Lupus érythémateux systémique	<b>PVDF</b>	Polyfluorure de vinylidène
<b>LKM</b>	<i>Liver Kidney Microsome</i>	<b>RCH</b>	Rectocolite hémorragique
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide	<b>RCP</b>	Réunion de concertation pluridisciplinaire
<b>MAG</b>	<i>Myelin-Associated Glycoprotein</i>	<b>RIA</b>	<i>Radioimmunoassay</i>
<b>MASP</b>	<i>MBL-Associated Serine Protease</i>	<b>RLA</b>	<i>Radioligand assay</i>
<b>MBG</b>	Membrane basale glomérulaire		
<b>MBL</b>	<i>Mannan Binding Lectin</i>		

<b>RNAP3</b>	ARN polymérase de type 3	<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>RNP</b>	Ribonucléoprotéine	<b>SRP</b>	<i>Signal Recognition Particle</i>
<b>RQ-PCR</b>	<i>Real Time Quantitative PCR</i>	<b>STR</b>	<i>Short Tandem Repeats</i>
<b>R-TSH</b>	Récepteur de la <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>	<b>TBIAb</b>	<i>Thyroid Binding Inhibition Antibodies</i>
<b>SAA</b>	Protéine sérique amyloïde A	<b>TG</b>	Thyroglobuline
<b>SAPL</b>	Syndrome des anti-phospholipides	<b>TM</b>	Tuberculose maladie
<b>SC</b>	Sous-cutané	<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>SCORAD</b>	<i>SCORing Atopic Dermatitis</i>	<b>TPO</b>	Thyroperoxydase
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	<b>TRAK</b>	<i>TSH-Rezeptor-AutoantiKörper</i>
<b>SEP</b>	Sclérose en plaques	<b>TRALI</b>	<i>Transfusion-Related Acute Lung Injury</i>
<b>SFC</b>	<i>Spot Forming Cells</i>	<b>TSAb</b>	<i>Thyroid Stimulating Antibody</i>
<b>SGPG</b>	Sulfo-glucuronyl-paragloboside	<b>TSBAb</b>	<i>Thyroid Stimulation Blocking Antibody</i>
<b>SGPLG</b>	Sulfo-glucuronyl-lactosaminyl-paragloboside	<b>TSH</b>	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
<b>SHU</b>	Syndrome hémolytique et urémique	<b>tTG</b>	Transglutaminase tissulaire
<b>SIC</b>	Substance intercellulaire	<b>VDRL</b>	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
<b>SLA</b>	<i>Soluble Liver Antigen</i>	<b>VGCC</b>	<i>Voltage-Gated Calcium Channel</i>
<b>SNAPS</b>	<i>Seronegative Anti-phospholipid Syndrome</i>	<b>VGKC</b>	<i>Voltage-Gated Potassium Channel</i>
		<b>VIH</b>	Virus de l'immunodéficience humaine
		<b>ZnT</b>	<i>Zinc Transporter</i>

## Stratégie d'exploration d'une hypersensibilité allergique



# Chapitre 1

## **Explorations humorales de l'allergie**

## Fiche 1.1

### Dosage des immunoglobulines E (IgE) totales circulantes

#### Signification biologique du paramètre

Les immunoglobulines E (IgE) sont synthétisées lors de certaines réponses adaptatives humorales et se fixent en majorité sur des récepteurs de forte affinité présents notamment à la surface des mastocytes et des basophiles. Elles représentent une classe d'anticorps particulièrement impliquée dans l'immunité antiparasitaire. Dans le sang, elles constituent une classe d'immunoglobulines solubles peu abondante. Leur dosage est indiqué pour détecter des augmentations pathologiques de leur concentration.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La concentration d'IgE totales circulantes étant une mesure de la capacité de l'individu à produire des IgE, quelle que soit leur spécificité, ce test ne peut être utilisé ni pour le dépistage de l'allergie ni dans le cadre d'un bilan d'anaphylaxie. Les principales indications du dosage des IgE totales sont la confirmation diagnostique ou le suivi de polysensibilisations, parasitoses (filarioses, schistosomiases, toxocarose, ascaridiose, hydatidose), urticaire chronique, dermatite atopique, aspergillose bronchopulmonaire, déficits immunitaires

(syndrome d'hyper-IgE ou de Job-Buckley), la maladie de Wiskott-Aldrich et d'autres entités accompagnées d'une élévation du niveau d'IgE circulantes par dérégulation des mécanismes lymphocytaires T. De plus, le titre d'IgE totales doit être déterminé avant d'envisager un traitement par omalizumab (anticorps anti-IgE). L'élévation du titre d'IgE totales chez l'enfant, surtout avant 3 ans, est un marqueur fiable d'atopie.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le dosage des IgE totales est un examen de première ou seconde intention selon le contexte. Une valeur normale d'IgE totales circulantes est un argument fort contre l'existence d'un terrain atopique; *a contrario*, une élévation de la concentration d'IgE totales sériques n'est pas spécifique d'un état atopique. Le dosage des IgE totales peut être normal chez 20 à 40 % des patients porteurs d'une allergie, alors qu'il peut être élevé dans la même proportion dans diverses circonstances pathologiques non liées à l'allergie (infections, y compris VIH, déficits immunitaires, tabagisme, etc.). C'est pourquoi l'apport du dosage des IgE totales est modeste dans le diagnostic d'allergie.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum ou plasma.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante si transport rapide ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré pendant 7 jours, congelé au-delà. Éviter les congélations et décongélations répétées.
<b>Principe méthodologique</b>	Le dosage des IgE est plus délicat que celui des autres classes d'immunoglobulines car la quantité d'IgE circulantes est environ 1 000 fois plus faible. Les IgE circulantes sont mises au contact de supports recouverts d'anticorps anti-IgE. Après lavage, un conjugué anti-IgE couplé à une enzyme ou à un fluorochrome ou fixé sur des billes de latex est ajouté. Sa fixation est révélée par chimioluminescence, immunofluorescence ou néphélométrie selon les fabricants. L'intensité du signal est proportionnelle à la concentration en IgE exprimée en kUI/L ou µg/L (standard OMS : 1 kUI = 2,4 µg).
<b>Type de méthode</b>	Automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Pratiquement indétectable à la naissance, la concentration en IgE croît jusqu'à 15 ans, puis décroît pour se stabiliser chez l'adulte, dont les valeurs de référence sont comprises entre 0 et 150 kUI/L. Chez les sujets atopiques, elle est dans une fourchette de quelques centaines de kUI/L. Elle est plus élevée dans les parasitoses et dans certaines dermatites atopiques (> 1 000 kUI/L). Une concentration très élevée (> 10 000 kUI/L) doit faire évoquer un syndrome d'hyper-IgE. Des valeurs dépassant 100 000 kUI/L peuvent être observées dans de rares cas de myélome à IgE. Dans l'aspergillose bronchopulmonaire allergique, une concentration d'IgE totales circulantes supérieure à 1 000 kUI/L est un critère diagnostique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les résultats doivent être interprétés selon l'âge et le contexte clinique.

## Fiche 1.2

**Dosage des immunoglobulines E (IgE) totales lacrymales****Signification biologique du paramètre**

La présence d'immunoglobulines E dans les larmes (IgE lacrymales) traduit une production locale de ces anticorps par les plasmocytes de la conjonctive.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La détection d'une production locale d'IgE est utile pour le diagnostic des allergies dont l'expression clinique est ophtalmologique, isolée.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce dosage peut être prescrit en première intention devant un tableau clinique évocateur de conjonctivite allergique isolée. Cet examen est complémentaire des explorations allergologiques locales ophtalmologiques ou systémiques cutanées ou sanguines, la synthèse d'IgE pouvant être limitée à la sphère oculaire.

<b>Nature du prélèvement</b>	Larmes et sérum le même jour.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Un volume de 50 à 100 µL de larmes par œil est suffisant car l'échantillon peut être testé après dilution. Elles peuvent être recueillies à la pipette dans le cul-de-sac conjonctival externe après sollicitation de la sécrétion lacrymale soit spontanément par application de l'embout stérile d'une pipette automatique soit par la méthode des oignons soit en approchant un tampon de coton imbibé de formol, soit enfin par mise en place d'une bandelette de Schirmer.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigération pendant 7 jours, congélation au-delà. Éviter les congélations et décongélations répétées.
<b>Principe méthodologique</b>	La concentration d'IgE lacrymales résulte de la conjonction d'une synthèse locale d'IgE et d'une filtration des immunoglobulines au travers de la barrière hémato-lacrymale. Le dosage concomitant de l'albumine et des IgE lacrymales et sériques permet de différencier une réaction immune locale d'une simple filtration. Les concentrations de l'albumine et des IgE lacrymales étant particulièrement faibles, des méthodes spécifiques doivent être utilisées. Les différentes méthodes de dosage de la microalbumine ont une sensibilité suffisante (autour de 25 mg/L) à condition de tester des larmes non diluées. Le calcul des IgE filtrées est donné par la formule : $\text{IgE totales filtrées} = \text{IgE totales sériques} \times (\text{Albumine lacrymale (g/L)/60})$ . Lorsque le taux des IgE lacrymales est compris entre 2 et 4 fois celui des IgE filtrées, on ne peut qu'évoquer une synthèse locale, tandis qu'on peut conclure à une synthèse locale lorsque le rapport est $> 4$ . La valeur moyenne de l'albumine lacrymale est de 50 mg/L et les valeurs usuelles des IgE totales lacrymales sont $< 1$ kUI/L avec une moyenne de 0,37 kUI/L.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Selon les auteurs, la sensibilité est de 80 à 90 % et la spécificité $> 90$ %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Une mesure isolée des IgE totales ou spécifiques lacrymales sans calcul des IgE filtrées n'a aucun intérêt diagnostique.

## Fiche 1.3

## Dépistage et dosage d'IgE spécifiques de pneumallergènes ou trophallergènes mélangés – Identification vis-à-vis d'un allergène unique

### Signification biologique du paramètre

La présence d'IgE spécifiques d'un allergène dans le sang circulant signe la sensibilisation d'un sujet à cet allergène, sans toutefois préjuger d'une signification clinique associée et donc d'une réaction allergique symptomatique lors d'une réexposition. La concentration des IgE spécifiques est parfois associée à la sévérité clinique. Elle n'est pas forcément corrélée à la concentration des IgE totales.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les IgE spécifiques doivent être recherchées en cas de suspicion d'une hypersensibilité de type I IgE-dépendante. La connaissance précise du profil de sensibilisation permet une prise en charge thérapeutique ciblée : éviction ou immunothérapies spécifiques. Les tests permettent de doser des IgE spécifiques soit d'un seul allergène (protéine ou source allergénique), soit d'un mélange d'allergènes

(représentatif de plusieurs sources allergéniques), proposé lorsque l'orientation clinique n'est pas ciblée. La disponibilité croissante de composants allergéniques purifiés, natifs ou recombinants, permet de disposer de très nombreux tests moléculaires, sans équivalent en tests cutanés, pour la recherche des IgE spécifiques. L'interprétation est délicate car les réactions croisées sont complexes et nombreuses.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ces dosages sont prescrits en seconde intention pour confirmer l'étiologie d'une allergie évoquée à la fois sur l'anamnèse et les résultats des tests cutanés. Ils peuvent éventuellement être utilisés en première intention lorsque les tests cutanés correspondants sont jugés dangereux pour le patient ou lorsque l'allergène à tester est disponible uniquement pour le diagnostic *in vitro*, ce qui est le cas de la plupart des allergènes moléculaires.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum ou plasma
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante si transport rapide ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigération pendant 7 jours, congélation au-delà. Éviter les congélations et décongélations répétées.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA, FEIA ou micropuce : ces méthodes utilisent des allergènes liés à une phase solide sur lesquels se fixent les IgE spécifiques du plasma ou du sérum. Un conjugué anti-IgE marqué par une enzyme ou un fluorochrome permet ensuite leur détection par immunofluorescence ou chimioluminescence. Il existe également des méthodes en phase liquide.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative (kU/L) sauf pour les mélanges.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité est évaluée entre 84 et 95 % et la spécificité entre 85 et 94 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Faux négatifs si prélèvement trop précoce ou sensibilisation contre une molécule ou un épitope sous-représenté dans le réactif. Faux positifs par fixation de faible spécificité en cas d'hyper-IgE. Sensibilisation contre les composants glucidiques d'allergènes végétaux sans retentissement clinique.

## Fiche 1.4

### **Profil de sensibilisation des IgE spécifiques par micropuce à composants allergéniques**

#### **Signification biologique du paramètre**

La présence d'IgE spécifiques d'un allergène dans le sang circulant signe la sensibilisation d'un patient à cet allergène sans toutefois préjuger d'une réaction allergique symptomatique lors d'une réexposition. Cependant, la concentration des IgE spécifiques est parfois associée à la sévérité clinique des réactions allergiques.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

L'exploration par micropuce permet d'étudier simultanément, dans un volume sanguin très réduit (30 µL), la sensibilisation d'un individu. Plus d'une centaine de composants allergéniques sont présents sur la micropuce, issus de nombreuses sources d'aéroallergènes, d'allergènes alimentaires ou de venins d'hyménoptères. Le test peut aussi être utilisé pour la détection de sensibilisations à IgG4 spécifiques. La réalisation de ce test est indiquée en cas d'allergies alimentaires multiples et sévères de l'enfant ou

de l'adulte, de polysensibilisation complexe nécessitant l'exploration de nombreuses familles allergéniques ou de suspicion de sensibilisation à un ou plusieurs pan-allergènes. On peut aussi l'utiliser en cas de discordance entre l'anamnèse, les tests cutanés et les tests unitaires.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce test doit être réalisé uniquement en seconde intention, après concertation clinico-biologique spécialisée, en complément de l'anamnèse, des tests cutanés et des dosages éventuels d'IgE spécifiques par tests unitaires. Exceptionnellement, il peut être réalisé en première intention lors de l'exploration spécialisée de dermatites atopiques sévères chez des patients polysensibilisés pour lesquels la réalisation des tests cutanés est difficile. L'exploration sur micropuce ne doit en aucun cas être utilisée comme test de dépistage de l'allergie.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum ou plasma.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante si transport rapide ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigération pendant 7 jours, congélation au-delà. Éviter les congélations et décongélations répétées.
<b>Principe méthodologique</b>	Les composants allergéniques recombinants ou purifiés sont fixés de manière covalente sur une lame de verre prétraitée sous forme de spots. La lame est incubée avec le sérum (ou plasma) puis avec un anticorps secondaire anti-IgE humaines marqué par un fluorochrome. À l'issue de la procédure technique, la fluorescence de chaque spot est mesurée avec un scanner laser à fluorescence, puis convertie en unités arbitraires. Un sérum de référence contenant des IgE dirigées contre certains des composants de la puce et à différents titres est utilisé pour établir une courbe d'étalonnage.
<b>Type de méthode</b>	Méthode manuelle, réalisée en petites séries ; une semi-automatisation des lavages est possible.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Une concordance de l'ordre de 80 % entre les tests unitaires et certaines micropuces a été rapportée. La valeur prédictive positive du test est comparable à celle des tests unitaires. Le CV% du test est plus élevé que celui des tests unitaires, en particulier pour les valeurs basses.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les limites du test sont celles du diagnostic allergologique par composants moléculaires (par exemple, « faux négatif » par sensibilisation à IgE vis-à-vis de composants absents de la micropuce). De faibles niveaux de sensibilisation peuvent ne pas être détectés, alors qu'ils le seraient avec un test unitaire utilisant le même allergène recombinant. Il n'y a pas d'équivalence ni de règle de conversion entre les unités arbitraires du test et celles des IgE spécifiques mesurées par test unitaire. Chez certains patients, compte tenu du grand nombre d'allergènes testés simultanément, des sensibilisations biologiques sans pertinence clinique peuvent être détectées.

## Fiche 1.5

**Dosage des IgG4 spécifiques****Signification biologique du paramètre**

Les IgG4 spécifiques d'allergène sont des témoins d'exposition de l'organisme à cet allergène. La spécificité et le titre des IgG4 spécifiques ne permettent pas de prévoir les réactions cliniques à l'introduction de l'allergène.

Au cours d'une immunothérapie spécifique (ITS, ou désensibilisation) ou d'une induction de tolérance, l'augmentation des titres d'IgG4 spécifiques de l'allergène est un indicateur d'efficacité thérapeutique (évolution inverse des titres d'IgE spécifiques et d'IgG4 spécifiques).

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Couplé à celui des IgE spécifiques, ce dosage participe au suivi de la réponse du patient au cours de

l'ITS ou de l'induction de tolérance. En pratique, le dosage des IgG4 spécifiques est relativement peu utilisé, car il n'est pas indispensable pour juger de l'efficacité de l'ITS ou de l'induction de tolérance et n'a pas d'indication *per se* dans le diagnostic ou le suivi d'allergie.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Dans le suivi de l'ITS, le dosage des IgG4 et des IgE spécifiques de l'allergène doit être réalisé avant le début du traitement, puis à intervalles réguliers en fonction du protocole de désensibilisation (quelques mois à un an).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum ou plasma.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante si transport rapide ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigération pendant 7 jours, congélation au-delà. Éviter les congélations et décongélations répétées.
<b>Principe méthodologique</b>	FEIA (immuno-fluoroenzymologie), ELISA (techniques maison), micropuce à allergènes avec révélation IgG4.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée (automate dédié) pour FEIA. Manuelle ou automatisable pour l'ELISA. Manuelle pour les micropuces.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Les valeurs physiologiques dépendent de l'âge et de l'allergène considéré. Au cours de l'ITS, une augmentation des IgG4 est attendue. Les résultats sont interprétés sous la forme de rapport IgG4/IgE ou l'inverse. Il faut cependant noter que les IgE spécifiques peuvent augmenter en début de traitement pour diminuer ensuite.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Le coefficient de variation pour la technique FEIA est de 20 %. Des fixations non spécifiques ont été rapportées pour la méthode commerciale FEIA pour certains allergènes, nécessitant l'utilisation des composants allergéniques.

## Bibliographie du chapitre 1

FICHE 1.1 – Dosage des immunoglobulines E (IgE) totales circulantes

Ozcan E, et al. Primary immune deficiencies with aberrant IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122 : 1054–62.

Matricardi PM, et al. Longitudinal trends of total and allergen specific IgE throughout childhood. *Allergy* 2009; 64 : 1093–8.

Lindberg RE, et al. Levels of IgE in serum from normal children and allergic children as measured by an enzyme immunoassay. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78 : 614–8.

Dati F, et al. Reference values for serum IgE in healthy non-atopic children and adults. *Clin Chem* 1982; 28 : 1556.

FICHE 1.2 – Dosage des immunoglobulines E (IgE) totales lacrymales

Batellier L, et al. Dosage des IgE totales dans les larmes : adaptation d'une technique immuno-enzymatique et intérêt de la recherche d'une synthèse locale d'IgE dans les conjonctivites chroniques. *Ann Biol Clin* 1999; 57 : 469–73.

Leonardi A. Allergy and allergic mediators in tears. *Exp Eye Res* 2013; 117 : 106–17.

FICHE 1.3 – Dépistage et dosage d'IgE spécifiques de pneumallergènes ou trophallergènes mélangés

Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 115 : 1291–6.

Wang J, et al. Correlation of serum allergy (IgE) tests performed by different assay systems. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121 : 1219–24.

Söderström L, et al. A further evaluation of the clinical use of specific IgE antibody testing in allergic diseases. *Allergy* 2003; 58 : 921–8.

FICHE 1.4 – Profil de sensibilisation des IgE spécifiques par micropuce à composants allergéniques

Hiller R, et al. Microarrayed allergen molecules : diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16 : 414–6.

Valenta R, et al. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29 : 896–904.

Bronnert M, et al. Component-resolved diagnosis with commercially available D. pteronyssinus Der p 1, Der p 2 and Der p 10 : relevant markers for house dust mite allergy. *Clin Exp Allergy* 2012; 42 : 1406–15.

Gaudin J-C, et al. Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clin Exp Allergy* 2008; 38 : 686–93.

Passalacqua G, et al. The additional values of microarray allergen assay in the management of polysensitized patients with respiratory allergy. *Allergy* 2013; 68 : 1029–33.

FICHE 1.5 – Dosage des IgG4 spécifiques

Van de Veen W, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131 : 1204–12.

McHugh SM, et al. A placebo-controlled trial of immunotherapy with two extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic rhinitis, comparing clinical outcome with changes in antigen-specific IgE, IgG, and IgG subclasses. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86 : 521–31.

Ozdemir C, et al. Mechanisms of immunotherapy to wasp and bee venom. *Clin Exp Allergy* 2011; 41 : 1226–34.

Wisniewski J, et al. Mechanisms of tolerance induction in allergic disease : integrating current and emerging concepts. *Clin Exp Allergy* 2013; 43 : 164–76.

Vickery BP, et al. Peanut oral immunotherapy modifies IgE and IgG4 responses to major peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131 : 128–34 e1–3.

FICHE 1.6 – Inhibition des IgE spécifiques

Severino MG, et al. European Polistes venom allergy. *Allergy* 2006; 61 : 860–3.

# Chapitre 2

## **Médiateurs**

## Fiche 2.1

**Dosage de la tryptase sérique ou plasmatique****Signification biologique du paramètre**

Les tryptases sont des protéases quasi spécifiques du mastocyte. Elles sont libérées en continu (sécrétion basale de formes immatures) ou brutalement (dégranulation anaphylactique de formes matures). Le dosage de la tryptase circulante mesure la somme des formes matures et immatures, et renseigne ainsi sur la richesse en mastocytes d'un individu donné et sur l'état d'activation des mastocytes.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage de la tryptase circulante est utilisé pour le diagnostic des anaphylaxies par dégranulation mastocytaire, le diagnostic et le suivi des mastocytoses systémiques, le suivi de certaines hémopathies malignes, l'évaluation du risque clinique en cas d'anaphylaxie chez des patients allergiques aux venins d'hyménoptères.

La tryptasémie basale est très stable chez un individu donné et doit être utilisée comme valeur de référence pour le diagnostic d'anaphylaxie. La tryptase circulante a une demi-vie d'environ deux heures.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Le dosage de la tryptase est indispensable en première intention devant une suspicion d'anaphylaxie (choc anaphylactique) avec au minimum deux prélèvements, dont l'un réalisé 30 minutes à 2 heures après l'événement clinique et le second au plus tôt 24 heures après l'événement. Le prélèvement doit être réalisé en léger différé par rapport au choc car l'élévation de la tryptase circulante n'est pas instantanée et des prélèvements trop précoces conduisent à de faux négatifs. Le prélèvement après retour à la valeur normale est également indispensable en raison des variations interindividuelles de la tryptasémie basale, qui imposent l'interprétation de la tryptasémie de choc en fonction de la valeur basale de l'individu. Un contrôle et/ou un suivi peuvent être nécessaires lorsque le niveau basal est trop élevé. La mise en évidence d'une élévation transitoire de la tryptase suggère une dégranulation mastocytaire. Quelles que soient les valeurs de la tryptasémie, le patient ayant présenté une anaphylaxie doit être adressé en consultation d'allergologie pour bilan étiologique. Ce paramètre présente également une valeur médico-légale, et il est possible de réaliser un prélèvement *post mortem*.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur tube sec, EDTA ou héparine.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	L'indication précise de l'horaire est indispensable. Pour les dosages ne nécessitant pas une détermination séquentielle : un seul prélèvement sans recommandation particulière.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante si transport rapide ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigération pendant 3 jours, congélation au-delà. Éviter les congélations et décongélations répétées.
<b>Principe méthodologique</b>	Immunodosage ELISA de type « sandwich » automatisé sur automate dédié. Il existe actuellement une seule méthode commerciale pour doser la tryptase. Cette méthode mesure sans les distinguer les tryptases matures et immatures, d'où le nom de « tryptase sérique totale ».
<b>Type de méthode</b>	Automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison et commercial.
<b>EEQ</b>	Oui.

<b>Performances du test</b>	La tryptase étant quasi spécifique du mastocyte, la mise en évidence de son augmentation dans le sang circulant signe la dégranulation (si transitoire) ou la surcharge/hyperactivité mastocytaire (si persistante).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	En cas d'anaphylaxie : un prélèvement unique ne permet pas d'objectiver une élévation de la tryptasémie par rapport à la valeur basale de l'individu. Faux négatifs : possibles si prélèvement trop précoce ou trop tardif. Faux positifs (rares) : tryptasémie basale élevée, prélèvement sur tube fluoré, présence d'un facteur rhumatoïde (inconstant).

## Fiche 2.2

### Dosage de l'histamine plasmatique

#### Signification biologique du paramètre

L'histamine est l'un des principaux médiateurs des réactions d'hypersensibilité immédiates. Elle est libérée lors de la dégranulation des mastocytes et des basophiles par pontage des IgE ou par des mécanismes indépendants des IgE, au cours de la transmission de l'influx nerveux, lors de l'activité des cellules entérochromaffines ou encore par activation indépendante des IgE des mastocytes et des basophiles. L'histamine peut également provenir de sources bactériennes (cas de la scombroidose, par dégradation bactérienne des tissus avariés).

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dosage de l'histamine plasmatique n'est pas un examen consensuel actuellement, bien qu'il ait été le seul outil biologique devant une anaphylaxie avant l'introduction du dosage de la tryptase. En France, il reste recommandé par la Société Française

d'Anesthésie et de Réanimation pour le diagnostic des réactions immédiates en anesthésie, ainsi que par la Société Française de Radiologie pour les réactions aux produits de contraste, mais ne figure pas dans la prise en charge des urgences allergologiques recommandée par l'Académie de médecine. Suite à l'évaluation de ce dosage par l'ANAES, cet examen n'est plus inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le dosage de l'histamine plasmatique au décours immédiat d'une réaction anaphylactique accompagne, en première intention, celui de la tryptase. Les résultats sont complétés par la recherche d'IgE spécifiques contre les molécules suspectes (pouvant être réalisée sur le même prélèvement que la tryptasémie) et par la consultation d'allergologie 4 à 6 semaines après la réaction.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur EDTA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le sang doit être prélevé le plus tôt possible après le début de la réaction. L'indication précise des horaires de la réaction et du prélèvement est indispensable.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Peu de centres effectuent encore ces dosages et le mode de conservation doit être spécifié par le laboratoire exécutant.
<b>Mode de conservation</b>	Plasma-EDTA pendant 48 heures à température ambiante ou 72 heures à +4 °C, congélation ensuite.
<b>Principe méthodologique</b>	Compétition radio-immunologique ou méthode immunoenzymologique (ELISA), après une acylation de l'échantillon permettant la reconnaissance de l'histamine acylée par l'anticorps de dosage.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Test peu pertinent en raison de la fixation de l'histamine à ses récepteurs <i>in vivo</i> .
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Nombreuses causes d'erreur par défaut ou par excès (contamination par dégranulation des basophiles).

## Fiche 2.3

### Dosage de la protéine cationique des éosinophiles (ECP)

#### Signification biologique du paramètre

La protéine cationique des éosinophiles (ECP, *Eosinophil Cationic Protein*) est un médiateur contenu dans les granules secondaires de l'éosinophile et libéré lors de l'activation cellulaire.

L'ECP est aussi augmentée au cours d'affections IgE-indépendantes : asthme non allergique avec intolérance à l'aspirine, polypose nasosinusienne, infections respiratoires, maladie de Churg et Strauss, syndrome d'hyperéosinophilie idiopathique.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La mesure de l'ECP sérique permet d'estimer la gravité de l'inflammation des voies aériennes et de suivre l'évolution d'un asthme. Le taux d'ECP augmente au cours des rhinites et de l'asthme allergiques, de la dermatite atopique et d'affections gastro-intestinales IgE-dépendantes : pathologies intestinales à éosinophiles (œsophagite, gastroentérite et colite), allergie alimentaire, parasitoses.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La mesure de l'ECP sérique est un examen de seconde intention peu utilisé dans le suivi des maladies allergiques. Il existe une forte variabilité interindividuelle de l'augmentation des niveaux d'ECP en pathologie et son évaluation ne présente pas d'intérêt diagnostique. Dans la dermatite atopique, la sévérité de la maladie est plus facilement évaluée par le score clinique SCORAD.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum sur tube sec avec séparateur de gel recueilli après 1-2 heures de coagulation à température stable (20–24 °C) ; larmes.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Ne pas utiliser de sérum hémolysé ou de plasma.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante pour le tube primaire uniquement (dans l'heure qui suit le prélèvement), sinon sérum.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigération pendant 5 jours, congélation au-delà.
<b>Principe méthodologique</b>	FEIA (fluoro-immunoenzymologie).
<b>Type de méthode</b>	Automatisée (automate dédié).
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	< 10 µg/L : absence d'inflammation à éosinophiles. > 15 µg/L : présence d'un état inflammatoire à éosinophiles. Dans le cadre d'un suivi thérapeutique, le patient constitue son propre témoin.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Il existe une variabilité interindividuelle importante. Les conditions préanalytiques strictes requises sont difficilement applicables lorsque le prélèvement n'est pas réalisé dans le laboratoire effectuant le dosage.

## Bibliographie du chapitre 2

## FICHE 2.1 – Dosage de la tryptase sérique ou plasmatique

- Schwartz LB, et al. Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989; 83 : 1551–5.
- Larcan A, et al. Prise en charge des urgences allergiques sévères. *Bull Acad Nat Méd* 2009; 193 : 2087–92.
- Borer-Reinhold M, et al. An increase in serum tryptase even below 11.4 ng/mL may indicate a mast cell-mediated hypersensitivity reaction : a prospective study in Hymenoptera venom allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2011; 12 : 1777–83.
- Brunel A, et al. Intérêt du dosage de la tryptase sérique aux urgences pédiatriques. *Rev Fr Allergol* 2011; 51 : 99–103.
- Vitte J, et al. Serum tryptase determination in acute allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131 : 1714.

## FICHE 2.2 – Dosage de l'histamine plasmatique

- Laroche D, et al. Radioimmunoassay for plasma histamine : a study of false positive and false negative values. *Br J Anaesth* 1995; 74 : 430–7.
- Dong SW, et al. Hypersensitivity reactions during anesthesia. Results from the ninth French survey (2005–2007). *Minerva Anesthesiol* 2012; 78 : 868–78.

## FICHE 2.3 – Dosage de la protéine cationique des éosinophiles (ECP)

- Guilpain P, et al. Les protéines cationiques de l'éosinophile : marqueurs d'activation du polynucléaire éosinophile. *Rev Méd Interne* 2006; 27 : 406–8.
- Moneret-Vautrin D-A. Le dosage de la protéine cationique des éosinophiles est-il un marqueur utile pour l'interniste? *Rev Méd Interne* 2006; 27 : 679–83.
- Kim K, et al. Serum eosinophil cationic protein in the clinical assessment of chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2013; 27 : e75–80.
- Wakamatsu TH, et al. IgE and eosinophil cationic protein (ECP) as markers of severity in the diagnosis of atopic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 2012; 96 : 581–6.

# Chapitre 3

## **Explorations cellulaires de l'allergie**

## Fiche 3.1

**Exploration de l'activation des basophiles par l'allergène****Signification biologique du paramètre**

L'activation des basophiles d'un échantillon sanguin *in vitro* en présence d'un allergène indique sa capacité à déclencher une réponse d'hypersensibilité immédiate *in vivo*. Au cours de ces réponses, la principale cellule effectrice est le mastocyte, d'exploration directe difficile compte tenu de sa localisation tissulaire. Le basophile présente une forte similarité fonctionnelle avec le mastocyte et constitue un outil intéressant pour l'exploration biologique puisqu'il est obtenu par une simple prise de sang.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

L'objectif est de reproduire la réaction physiopathologique d'hypersensibilité immédiate, principalement dépendante des IgE, par une activation des basophiles. Ces tests sont applicables au dia-

gnostic étiologique des réactions immédiates (< 30 minutes) ou semi-retardées (< 24 heures). Ils permettent également de suivre l'efficacité de l'immunothérapie spécifique (venins d'hyménoptères) ou de l'éviction de l'allergène.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce test se place en première intention s'il s'agit de décider ou suivre une immunothérapie ou de pallier une carence des autres tests (risque clinique trop important avec les tests cutanés et/ou absence de réactifs commerciaux pour la recherche d'IgE sériques spécifiques). C'est un test de deuxième ou troisième intention, après les tests cutanés et les dosages d'IgE sériques lorsque ces outils sont disponibles, s'il s'agit de mieux documenter un cas difficile. Il est potentiellement utilisable pour tout allergène soluble.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang total sur EDTA, ACD ou héparine selon la méthode utilisée : se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le moment optimal de prélèvement se situe entre 4 à 6 semaines après une réaction et avant 12 mois.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Mode de conservation</b>	Réalisation le plus rapidement possible après prélèvement.
<b>Principe méthodologique</b>	Dans un premier temps, les cellules sanguines non isolées sont mises en contact avec plusieurs concentrations de l'allergène suspecté. L'activation des basophiles est ensuite mesurée par le dosage de médiateurs libérés dans le surnageant ou par détection de l'intensité d'expression de marqueurs membranaires en cytométrie en flux (par exemple, CD63, CD203c).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Chaque patient constitue son propre contrôle de qualité interne.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Selon les auteurs et les molécules testées, la sensibilité est de 50 à 80 % et la spécificité de 80 à 90 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Prélèvement trop précoce ou trop tardif par rapport à la réaction à explorer. Insolubilité ou toxicité de la molécule à tester.

## Fiche 3.2

### Exploration de l'activation lymphocytaire par l'allergène

#### Signification biologique du paramètre

L'activation des lymphocytes T d'un échantillon sanguin *in vitro* en présence d'un allergène indique la présence de lymphocytes T mémoire spécifiques.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

En immunoallergologie, ce test est utilisé pour le diagnostic d'une réaction retardée dont les signes cliniques apparaissant au plus tôt 48 heures après le contact avec l'allergène suspect. En pathologie pro-

fessionnelle, ce test est utilisé pour la mise en évidence d'une sensibilisation, par exemple, aux métaux.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce test est utilisé pour l'exploration des réactions principalement médicamenteuses en première ou seconde intention (après les tests cutanés) lorsqu'il s'agit d'une réaction retardée, soit en complément de l'activation des basophiles par l'allergène dans le cas de réactions observées avant 48 heures, lorsqu'une composante retardée est suspectée.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang total sur EDTA, ACD ou héparine selon la méthode utilisée : se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le moment optimal de prélèvement se situe entre 4 à 6 semaines après une réaction et avant 6 mois.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Mode de conservation</b>	Réalisation le plus rapidement possible après prélèvement.
<b>Principe méthodologique</b>	L'étude de la réactivité des lymphocytes est réalisée par cytométrie en flux après contact de sang total avec l'allergène suspecté dans un milieu de culture pendant 24 heures (CD69) ou 5-7 jours (CD25). Un test complet comprend 1 ou 2 témoins négatifs, un contrôle positif (PHA) et 3 dilutions successives de l'allergène à tester. La réponse des lymphocytes à l'allergène peut être appréciée sur d'autres critères, comme la prolifération induite par l'allergène ou la mesure de la quantité et du profil de cytokines produites.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, nécessitant un cytomètre en flux.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Chaque patient constitue son propre contrôle de qualité interne.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Selon les auteurs, la sensibilité est de 65 à 80 % et la spécificité de 80 à 90 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Prélèvement trop précoce ou trop tardif par rapport à la réaction à explorer. Insolubilité ou toxicité de la molécule à tester.

## Bibliographie du chapitre 3

### FICHE 3.1 – Exploration de l'activation des basophiles par l'allergène

- Macglashan Jr. D. Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132 : 777–87.
- Rubio A, et al. Benefit of the basophil activation test in deciding when to reintroduce cow's milk in allergic children. *Allergy* 2011; 66 : 92–100.
- Abuaf N, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy* 2008; 38 : 921–8.
- Rouzaipe P, et al. Negativity of the basophil activation test in quinolone hypersensitivity : a breakthrough for provocation test decision-making. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157 : 299–302.
- De Weck AL, et al. Diagnostic tests based on human basophils : more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146 : 177–89.

### FICHE 3.2 – Exploration de l'activation lymphocytaire par l'allergène

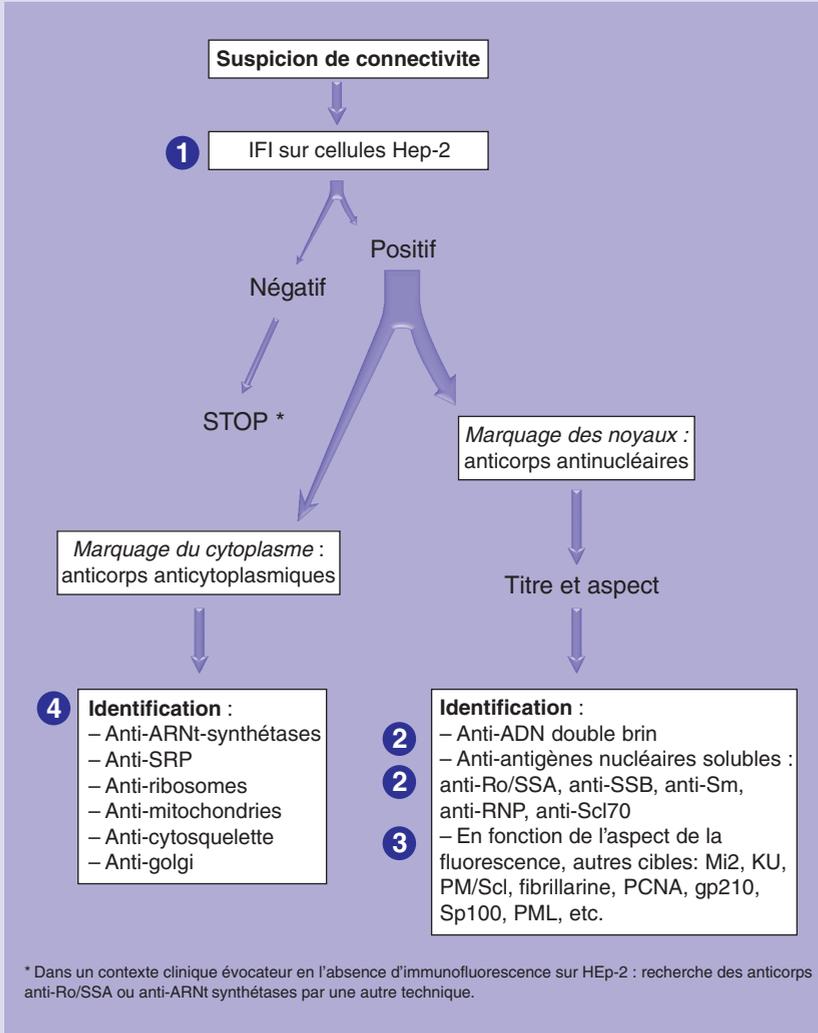
- Thong B, et al. A World Allergy Organization international survey on diagnostic procedures and therapies in drug allergy/hypersensitivity. *World Allergy Organ J* 2011; 4 : 257–70.
- Kimura M, et al. Usefulness of lymphocyte stimulation test for the diagnosis of intestinal cow's milk allergy in infants. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157 : 58–64.
- Martin AK, et al. Beryllium-specific CD4 + T cells in blood as a biomarker of disease progression. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128 : 1100–6.
- Porebski G, et al. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clin Exp All* 2011; 41 : 461–70.
- Bonvalet M, et al. Comparison between major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface expression of activation markers for the detection of allergen-specific CD4 + T cells. *Clin Exp Allergy* 2011; 41 : 821–9.

# Chapitre 4

## **Exploration des maladies systémiques**

## Synopsis II

## Recherche et identification des anticorps antinucléaires (toutes spécificités), anti-cytoplasme (ribosomes, etc.)



## Fiche 4.1

### **Anticorps antinucléaires : recherche et titrage par IFI sur cellules HEp-2**

#### **Signification biologique du paramètre**

Les anticorps antinucléaires (AAN) sont dirigés contre un grand nombre de cibles antigéniques nucléaires (chromosomes, nucléoplasme, matrice nucléaire, nucléole, membrane nucléaire, etc.). L'intérêt de leur identification réside dans l'aide au diagnostic de différentes maladies auto-immunes systémiques (connectivites) et de certaines hépatopathies, mais aussi au cours de pathologies infectieuses ou néoplasiques ou induites par certains médicaments. Enfin, il faut souligner la présence des AAN chez les sujets sains, en particulier âgés, avec une prédominance féminine. Les résultats sont donc à interpréter en fonction du contexte clinique et des cibles antigéniques identifiées.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dépistage des AAN s'effectue par immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules HEp-2, généralement à des dilutions sériques au 1/80 ou au 1/160 (seuil de positivité). En cas de résultat positif, il faut décrire l'aspect de la fluorescence observée et donner un titre par dilution du sérum jusqu'à la dilution limite (ou au moins supérieur au 1/1 000). Les principales indications sont les suspicions de maladie systémique (syndrome de Gougerot-Sjögren, lupus

érythémateux systémique, syndrome de Sharp ou connectivite mixte, sclérodermie systémique, polymyosite, dermatomyosite, arthrite juvénile idiopathique) et les suspicions d'hépatite auto-immune de type 1 ou de cirrhose biliaire primitive.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

La recherche des AAN doit être réalisée en première intention par IFI sur cellules HEp-2.

En cas de résultat positif et, selon l'aspect de fluorescence observée, il est nécessaire d'identifier les cibles pour augmenter la puissance diagnostique et pronostique du test. Cette identification fait appel à d'autres approches méthodologiques. On recherche principalement les anticorps anti-ADN double brin (ou anti-ADN natif) (cf. Fiche 4.2) et les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (SSA, SSB, Sm/RNP, Jo1, Scl70) (cf. Fiche 4.3). D'autres spécificités peuvent être recherchées en fonction du contexte clinique. L'immunofluorescence sur cellules HEp-2 suffit à l'identification des anticorps anti-centromère. L'IFI sur cellules HEp-2 permet aussi de détecter des anticorps dirigés contre des composants du cytoplasme (anticytoplasmiques), qui ne doivent pas être dénommés antinucléaires mais dont la cible suspectée doit être identifiée (cf. Fiche 7.1) car certains ont un intérêt diagnostique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Pas de contrainte d'acheminement : transport à température ambiante si < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	IFI standard sur cellules HEp-2 ( <i>Human Epithelioma 2</i> ) ou cellules HEp-2000® transfectées avec le gène codant l'antigène SSA 60 kDa. On recherche habituellement les IgG mais certains coffrets permettent d'identifier d'autres isotypes. Pour la détection des anticorps anti-membrane nucléaire, le substrat le plus sensible reste les coupes de foie de rat.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisable (automate préparateur de lames).
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La recherche d'AAN est un test très sensible mais non spécifique d'une pathologie donnée. La performance du test est étroitement dépendante de l'expérience du lecteur.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Si la spécificité des AAN n'est pas identifiée, leur intérêt est relativement limité. Des variations des aspects et des titres de fluorescence dépendent du type de préparation des cellules (culture, fixation) et des anti-globulines utilisées (mono- ou polyspécifiques). Certains sérums peuvent contenir plusieurs anticorps antinucléaires : certains AAN de titres élevés peuvent masquer d'autres AAN de titre plus faible. Ceci justifie une identification large des spécificités.

## Fiche 4.2

### Anticorps anti-ADN double brin

#### Signification biologique du paramètre

Les anticorps anti-ADN double brin (ADNdb, dsDNA, ou ADN natif) reconnaissent des épitopes conformationnels de l'acide désoxyribonucléique bicaténaire. Leur détection et leur quantification sont utiles essentiellement pour le diagnostic du lupus érythémateux systémique (LES) et le suivi des patients. Les anticorps anti-ADN forment un groupe très hétérogène avec des anticorps qui ne reconnaissent que l'ADNdb, ceux qui interagissent avec l'ADNdb mais aussi simple brin (ADNsb) et ceux qui ne reconnaissent que l'ADNsb. Les anticorps anti-ADNsb, rencontrés dans de nombreuses maladies, n'ont pas d'intérêt diagnostique.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'objectif du test est la détection et la détermination semi-quantitative ou quantitative des anti-ADNdb. Les IgG anti-ADNdb sont considérées comme le marqueur sérique le plus important du lupus érythémateux systémique. Chez ces patients, leur concentration sérique est corrélée à la fré-

quence et à la sévérité de l'atteinte rénale. De plus, l'augmentation de leur titre évoque une poussée ou une rechute, tandis que leur diminution témoigne d'une réponse thérapeutique, sans que cette corrélation soit absolue. Cependant, les résultats doivent être interprétés dans l'ensemble du contexte clinique et biologique car ces anticorps sont observés au cours d'autres connectivites ou d'hépatites auto-immunes.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le dosage des anticorps anti-ADNdb est un examen de seconde intention qui doit être effectué après la recherche et le titrage des anticorps anti-nucléaires totaux (AAN) (cf. Fiche 4.1). Les anticorps anti-ADNdb sont recherchés de façon systématique lorsque l'aspect de fluorescence des AAN est de type anti-chromatine, c'est-à-dire homogène avec marquage des cellules en mitose, mais aussi en présence d'un autre aspect de fluorescence de titre élevé ou en l'absence d'AAN lorsque le diagnostic de lupus érythémateux systémique est fortement suspecté.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i> La recherche des anticorps anti-ADNdb dans d'autres liquides biologiques (liquide pleural, liquide d'ascite, LCR) n'est pas pertinente.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Le test de Farr en RIA consiste en la précipitation des immuns complexes formés par l'ADNdb radiomarqué et le sérum à tester suivie de la mesure de la radioactivité du précipité. Il détecte les anticorps (IgG, IgA, IgM) de haute affinité pour l'ADNdb. Il est considéré comme un test de référence. L'IFI standard sur étalement de <i>Crithidia luciliae</i> (qui présentent un kinétoplaste d'ADNdb circulaire) s'effectue avec le sérum pur et dilué au 1/10 <sup>e</sup> , puis par titration. Elle peut utiliser des anti-globulines monospécifiques (IgG) ou polyspécifiques. L'ELISA, la FEIA et l'ALBIA peuvent aussi être utilisées ainsi que des immunodots pour le dépistage.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle pour le RIA. Manuelle ou semi-automatisable (automate préparateur de lames) pour l'IFI. Manuelle et automatisable pour ELISA, FEIA, ALBIA.
<b>Type de mesure</b>	IFI et immunodots : qualitative avec données quantifiables. RIA, ELISA, ALBIA, FEIA : quantitative. Malgré l'existence d'un étalon international ( <i>WHO standard</i> ) auquel se réfèrent les différentes techniques commerciales, les seuils et les résultats rendus en UI ne sont pas comparables entre les différents coffrets.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux
<b>EEQ</b>	Oui
<b>Performances du test</b>	La sensibilité et la spécificité des techniques dépendent de l'avidité des anticorps, du type de substrat et des isotypes des anticorps détectés. Les tests ELISA détectant à la fois les anticorps de faible et forte affinité sont les tests les plus sensibles mais les moins spécifiques du lupus érythémateux systémique. L'IFI détecte les anticorps de forte et moyenne avidité. Le test de Farr détecte les anticorps de forte affinité. Un titre élevé d'IgG anti-ADNdb est fortement associé à un lupus érythémateux systémique. Des IgM anti-ADNdb de titre élevé mais sans signification clinique peuvent apparaître au cours de traitement par les anti-TNF ou de façon transitoire au cours de certaines infections virales.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La source antigénique utilisée (ADN purifié, contamination par des histones, présence d'ADN dénaturé, etc.) constitue un point crucial et il est important pour le diagnostic du lupus érythémateux systémique de détecter les anticorps anti-ADNdb. Le test de Farr reste limité à certains laboratoires du fait de l'emploi d'isotopes. L'IFI dépend de l'interprétation correcte de l'aspect de la fluorescence par le biologiste. L'ELISA ne fait pas toujours la différence entre anticorps anti-ADNdb et anti-ADNsb. Il peut être recommandé d'utiliser deux techniques de détection en raison des différences observées selon la méthodologie employée qui peut révéler seulement certains anticorps, en particulier selon leur avidité. Il est recommandé de suivre l'évolution du titre des anticorps chez un patient par les mêmes réactifs compte tenu de la dispersion des valeurs de référence.

## Fiche 4.3

### Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

#### Signification biologique du paramètre

Les antigènes nucléaires solubles (ENA, pour *Extractible Nuclear Antigens*, terme utilisé pour désigner les protéines nucléaires solubles en tampon phosphate) sont des cibles antigéniques des anticorps antinucléaires (AAN) détectés sur cellules HEP-2. On décrit des anticorps anti-SSA/Ro60, anti-SSB/La, anti-Sm, anti-U<sub>1</sub>RNP (composé des sous-unités protéiques 70 kDa, A et C), anti-ADN-topoisomérase 1 (Scl70) et également contre l'antigène cytoplasmique histidyl-aminoacyl transférase (Jo1). L'identification des anti-ENA a un grand intérêt car ils peuvent être de bons marqueurs diagnostiques, parfois spécifiques et parfois à valeur pronostique, de différentes maladies systémiques. Ainsi, les anti-Sm sont des marqueurs spécifiques du lupus érythémateux systémique et les anti-ADN-topoisomérase 1 (anti-Scl70) sont spécifiques des sclérodermies systémiques.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les anti-ENA sont recherchés en cas de suspicion de connectivite (syndrome de Gougerot-Sjögren, lupus érythémateux systémique, sclérodermie systémique, polymyosite, syndrome de Sharp, etc.),

dont les signes cliniques très variés sont souvent communs à plusieurs pathologies. L'identification des anticorps permet de les différencier ou de montrer des syndromes de chevauchement. L'identification suffit au diagnostic, les titres n'ayant pas de valeur pronostique.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'un examen de seconde intention, à effectuer après la recherche et le titrage des AAN par IFI sur HEP-2 (cf. Fiche 4.1), ou en première intention en cas de suspicion d'anti-SSA. Les anti-ENA sont habituellement recherchés en deux temps. Le dépistage est réalisé avec un mélange d'antigènes puis, en cas de positivité, une identification de la ou des spécificités est effectuée. L'aspect de fluorescence sur cellules HEP-2 oriente et reste indispensable à une interprétation adéquate des résultats d'identification. Certaines spécificités correspondant à des antigènes non présents ou en trop faible quantité dans les tests de dépistage doivent être recherchées par des techniques spécifiques, orientées par l'aspect de fluorescence des AAN ou par les données cliniques (par exemple, anti-PCNA, anti-Mi2, anti-Ku, anti-PM/Scl).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les techniques de dépistage font essentiellement appel aux techniques immunoenzymatiques (ELISA, FEIA), à l'électrosynérèse et à l'immunodiffusion double de type Ouchterlony. Les techniques d'identification des spécificités sont l'ELISA, l'ALBIA, l'immunodot ou immunoline, la FEIA et l'immunodiffusion double de type Ouchterlony.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles, automatisables, automatisées.
<b>Type de mesure</b>	Ouchterlony et électrosynérèse : qualitatives. ELISA, ALBIA, immunodot ou immunoline, FEIA : qualitatives à données quantifiables. En l'absence de sérum de référence quantifié, les valeurs données par ces tests ne correspondent qu'à des unités arbitraires et ne peuvent être comparées entre elles.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	L'ELISA et les méthodes dérivées sont les plus utilisées et sont très sensibles. Les principaux inconvénients de la technique d'Ouchterlony sont son manque de sensibilité et la nécessité de disposer de sérums de référence et de sources antigéniques d'excellente qualité. De plus, cette technique, réservée aux centres de référence, ne met en évidence que les anticorps précipitants et ne se prête pas aux dépistages d'urgence. L'électrosynérèse est plus sensible que l'Ouchterlony mais sa réalisation présente plus de difficultés techniques, ce qui en fait une méthode réservée à certains centres experts. Les anti-Sm sont présents dans 15 à 30 % des cas de lupus érythémateux systémique, les anti-U <sub>1</sub> RNP dans 20 à 30 % des lupus érythémateux systémiques et 93 % des connectivites mixtes, mais peuvent être observés dans d'autres pathologies. Les anti-SSA/Ro60 sont présents dans 70 % des syndromes de Gougerot-Sjögren et 35 % des lupus érythémateux systémiques. Chez la femme enceinte, la présence d'anti-SSA signe un risque de lupus néonatal et/ou de bloc auriculoventriculaire congénital. Les anti-SSB/La sont présents dans plus de 40 % des syndromes de Gougerot-Sjögren et 35 % des lupus érythémateux systémiques, pratiquement toujours associés aux anti-SSA. Les anti-Scl70 sont très spécifiques des sclérodermies systémiques mais présents chez 50 à 70 % des patients (cf. Fiche 4.6). Les anti-PCNA sont très rares au cours du lupus érythémateux systémique (< 5 %) mais semblent spécifiques. La majorité des coffrets incluent l'antigène SSA/Ro52, dont la valeur clinique reste à établir, et l'antigène cytoplasmique soluble Jo1 (cf. Fiche 7.1).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les techniques d'Ouchterlony et d'électrosynérèse utilisent des extraits cellulaires comme source antigénique, donc des antigènes natifs qui peuvent comprendre aussi des antigènes cytoplasmiques. Les autres techniques utilisent des combinaisons restreintes d'antigènes dont les sources peuvent varier selon les coffrets : molécules natives purifiées, protéines recombinantes (avec ou sans modifications post-traductionnelles) ou encore des peptides pouvant être à l'origine de différences importantes dans les résultats entre les techniques. La parfaite connaissance de la nature des antigènes utilisés est indispensable à la bonne interprétation des résultats. La technique de western blot ne devrait plus être utilisée car des antigènes différents ont des masses moléculaires très proches. Elle est remplacée par les techniques d'immunodot (ou immunoline).

## Fiche 4.4

### Anticorps anti-nucléosomes

#### Signification biologique du paramètre

Le nucléosome est constitué d'ADN double brin d'une longueur de 146 paires de bases enroulé autour des histones H2A, H2B, H3 et H4, l'ensemble étant «fermé» par l'histone H1. Au cours du lupus érythémateux systémique, des anticorps anti-ADN double brin et des anticorps anti-histones peuvent avoir également une réactivité anti-nucléosome. Des anticorps dits nucléosome-restreints reconnaissent des épitopes conformationnels du complexe H2A-H2B/ADN; leur concentration serait corrélée à l'activité de la glomérulonéphrite lupique.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La détection et la quantification des anticorps anti-nucléosomes sont utiles en cas de suspicion de lupus érythémateux systémique, en présence d'anticorps antinucléaires d'aspect homogène sans anti-ADN double brin.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'un examen de troisième intention après la recherche des AAN (cf. [Fiche 4.1](#)), des anti-ADN double brin (cf. [Fiche 4.2](#)) et des anti-ENA (cf. [Fiche 4.3](#)).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Immunodot, ELISA, ALBIA.
<b>Type de méthode</b>	Automatisable pour l'ELISA et l'ALBIA ; semi-automatisable pour l'immunodot.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative : immunodot. Quantitative : ELISA, ALBIA.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Les anticorps anti-nucléosomes sont rapportés chez environ 85 % des sujets atteints de lupus érythémateux systémique et chez 15 à 30 % des patients lupiques sans anti-ADN double brin.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Il existe une interférence possible avec les anticorps anti-ADN double brin et anti-histones. Il y a des variations des résultats entre les différents coffrets commerciaux selon les techniques de préparation de l'antigène.

## Fiche 4.5

**Anticorps anti-histones****Signification biologique du paramètre**

Les anticorps anti-histones reconnaissent des épitopes exposés à la surface de la chromatine sur les extrémités N-terminales des histones H2-B et H4 et C-terminales des histones H1, H2-A et H3, constituants protéiques du nucléosome. Ils sont présents chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique mais, le plus souvent, ces patients ont également des anticorps anti-ADNdb. De plus, ils peuvent être présents au cours de lupus érythémateux systémiques induits par un médicament, de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres pathologies auto-immunes. Les anticorps anti-histones ont peu, voire pas, d'utilité car ils

ont peu de spécificité diagnostique, étant retrouvés dans de nombreuses circonstances pathologiques autres que les connectivites.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche des anticorps anti-histones a une bonne valeur prédictive négative et est utile pour écarter l'hypothèse d'un lupus érythémateux systémique induit s'ils ne sont pas détectés.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Pas d'intérêt diagnostique documenté.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA, immunodot, ALBIA.
<b>Type de méthode</b>	ELISA et ALBIA : automatisables. Immunodot : semi-automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Présence à fréquence variable selon les pathologies. Ils ont peu de spécificité diagnostique y compris pour le lupus induit par un médicament.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularités.

## Fiche 4.6

### **Autoanticorps associés à la sclérodermie systémique autres que les anti-centromère et anti-ADN-topoisomérase 1 (Scl70)**

#### Signification biologique du paramètre

Différents autoanticorps antinucléaires plus rares que les anti-centromère et les anti-Scl70 (cf. Fiche 4.3) ont été identifiés pour leur intérêt diagnostique au cours de la sclérodermie systémique. Les anti-ARN polymérase de type 3 (anti-RNAP3) donnent différents aspects de fluorescence sur cellules HEp-2, le plus souvent nucléaire moucheté. La présence d'anticorps anti-RNAP3 peut toutefois s'observer en l'absence de fluorescence nucléaire sur cellules HEp-2. Les anti-fibrillarine (dénommés aussi anti-U<sub>3</sub>RNP), les anti-Th/TO, les anti-NOR90, les anti-PM/Scl donnent un aspect nucléolaire sur cellules HEp-2. La fluorescence nucléolaire associée est différente pour chacune de ces spécificités.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Tous ces anticorps constituent des marqueurs diagnostiques, pour certains spécifiques, des formes systémiques de sclérodermie et sont associés à des formes cliniques particulières de la maladie leur conférant une valeur pronostique. Les anticorps anti-RNAP3 et anti-fibrillarine sont associés aux formes cutanées diffuses, alors que les anticorps

anti-Th/TO, anti-NOR90 et anti-PM/Scl sont associés aux formes cutanées limitées. Les anti-RNAP3 sont associés au risque d'atteinte rénale, en particulier de crise rénale sclérodermique. Les anti-fibrillarine et les anti-Th/TO sont particulièrement associés à la fibrose pulmonaire. Les anti-PM/Scl sont principalement rencontrés au cours des syndromes de chevauchement sclérodermie systémique/myosite. Les anti-NOR90 ne sont pas spécifiques de la sclérodermie. La présence d'anticorps anti-RNAP3, anti-fibrillarine et anti-Th/TO est de mauvais pronostic. Le pronostic est moins sombre en présence d'anti-PM/Scl et anti-NOR90 mais il y a peu de données dans la littérature, parfois discordantes.

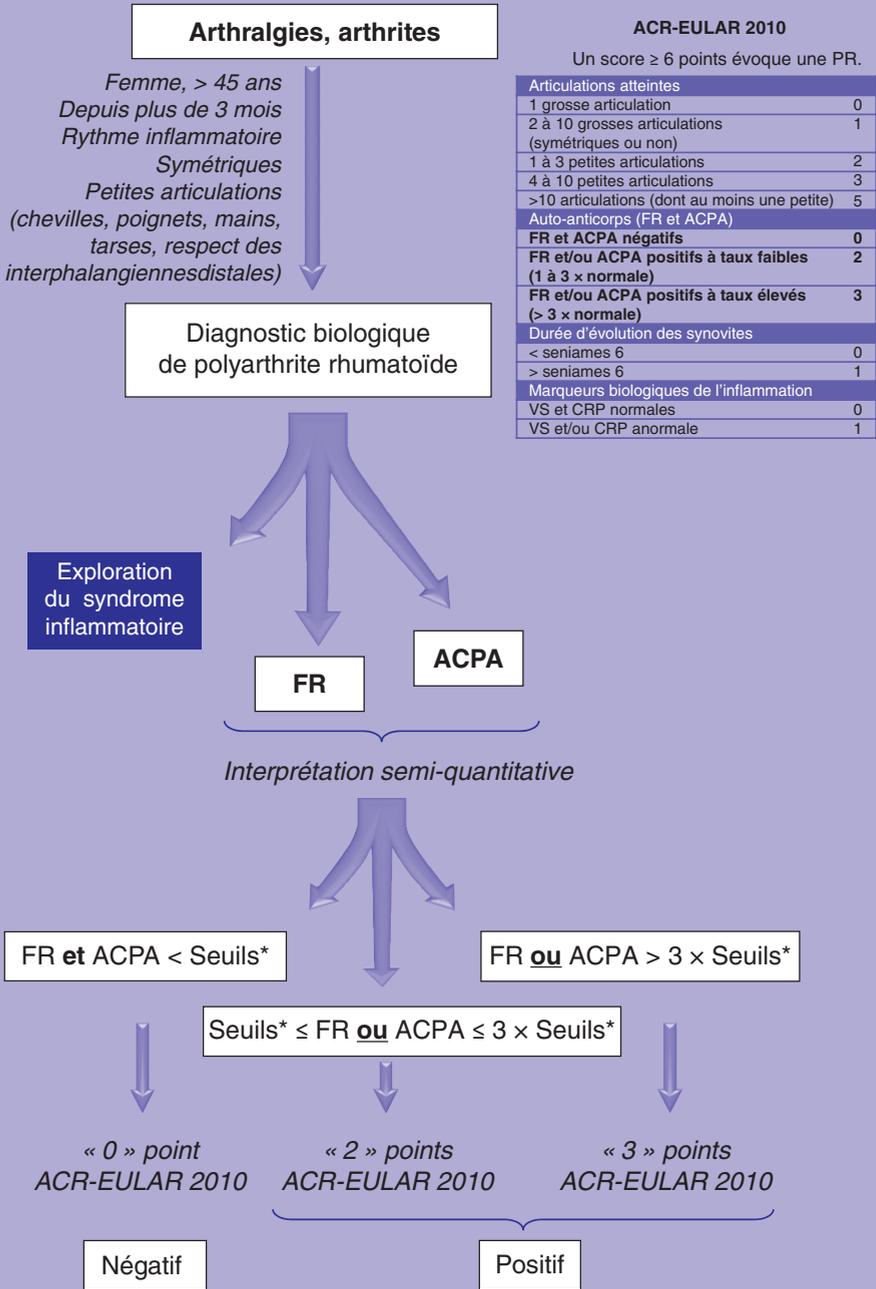
#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Les anti-RNAP3 peuvent être recherchés en première intention en cas de contexte clinique évocateur de sclérodermie systémique, quel que soit le résultat du dépistage des anticorps antinucléaires, en raison de l'inconstance de la positivité et de l'aspect de ces derniers. Les autres autoanticorps sont recherchés en seconde intention en présence d'anticorps antinucléaires à titre significatif (> 1/640) dans un contexte clinique évocateur.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Immunodot, ELISA, FEIA. Les antigènes utilisés sont le plus souvent des protéines recombinantes.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable pour l'ELISA. Manuelle ou semi-automatisable pour l'immunodot.
<b>Type de mesure</b>	ELISA et FEIA : quantitative (unités arbitraires). Immunodot, Ouchterlony, western blot : qualitative. La quantification n'est pas utile à la prise en charge.
<b>CIQ</b>	Maison
<b>EEQ</b>	Non
<b>Performances du test</b>	Ces anticorps ont une faible sensibilité diagnostique pour la sclérodémie systémique : 4 à 20 % pour les anti-RNAP3, 1,5 à 19 % pour les anti-fibrillarine, moins de 5 % pour les anti-Th/TO et anti-NOR90, 4 à 11 % pour les anti-PM/Scl. La sensibilité pour l'atteinte rénale des anti-RNAP3 est d'environ 25 % et ils sont présents chez un tiers des patients ayant une atteinte rénale. La spécificité de la plupart de ces autoanticorps est supérieure à 95 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les tests utilisant des protéines recombinantes doivent être interprétés en tenant compte des aspects d'immunofluorescence sur cellules HEp-2.

Synopsis III

Prescription des marqueurs biologiques de la polyarthrite rhumatoïde



**ACR-EULAR 2010**

Un score ≥ 6 points évoque une PR.

<b>Articulations atteintes</b>	
1 grosse articulation	0
2 à 10 grosses articulations (symétriques ou non)	1
1 à 3 petites articulations	2
4 à 10 petites articulations	3
>10 articulations (dont au moins une petite)	5
<b>Auto-anticorps (FR et ACPA)</b>	
FR et ACPA négatifs	0
FR et/ou ACPA positifs à taux faibles (1 à 3 x normale)	2
FR et/ou ACPA positifs à taux élevés (> 3 x normale)	3
<b>Durée d'évolution des synovites</b>	
< 6 semaines	0
> 6 semaines	1
<b>Marqueurs biologiques de l'inflammation</b>	
VS et CRP normales	0
VS et/ou CRP anormale	1

FR, facteurs rhumatoïdes ; ACPA, anticorps anti-peptides ou protéines citrulliné(e)s.

\* Sont considérés les seuils des différentes trouses de dosage, quels que soient les fournisseurs.

## Fiche 4.7

### Facteurs rhumatoïdes (FR)

#### Signification biologique du paramètre

Les facteurs rhumatoïdes (FR) sont des autoanticorps anti-IgG, le plus souvent d'isotype IgM. Ils apparaissent au cours de processus inflammatoires chroniques quelle qu'en soit l'origine. On les rencontre au cours de la polyarthrite rhumatoïde (PR), mais aussi dans d'autres connectivites (syndrome de Gougerot-Sjögren, lupus érythémateux systémique) ou dans les vascularites à anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA). Enfin, ils apparaissent aussi au cours de divers processus inflammatoires non associés aux maladies auto-immunes (cancers ou infections) et même chez des sujets sains : *ils manquent donc particulièrement de spécificité pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.*

On décrit :

- des FR dirigés contre des IgG animales (lapin, particulièrement, classiquement révélés par le test de Waaler-Rose, groupe 1) ;
- des FR anti-IgG humaines (classiquement associés au test « latex », groupe 2).

Les FR anti-IgG humaines sont d'apparition précoce, constituant un test sensible, mais peu spécifique. La présence de FR anti-IgG animales traduit une grande polyclonalité de la réponse immunitaire avec une diversification de la spécificité des anticorps. Elle est plus tardive et restreinte aux maladies les plus inflammatoires. Les tests biolo-

giques recherchant les FR anti-IgG animales sont moins sensibles mais plus spécifiques pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde. Cependant, on peut détecter des FR anti-IgG animales au cours des vascularites à ANCA ou du syndrome de Gougerot-Sjögren. Un titre élevé de FR est décrit comme associé à une évolution plus agressive de la polyarthrite rhumatoïde. Cette notion est reprise dans les critères de l'ACR EULAR 2010.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dosage des FR vise à préciser leur présence éventuelle et, le cas échéant, à apprécier leur titre : faible à modéré ou élevé.

La principale indication s'inscrit dans le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde, même si de nombreuses circonstances inflammatoires et auto-immunes autres que la polyarthrite rhumatoïde s'associent à la présence de FR.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Dans le cadre du diagnostic biologique de la polyarthrite rhumatoïde, la recherche des FR est prescrite en première ligne en combinaison avec celle des anticorps anti-peptides cycliques ou protéines citrullinés (ACPA, pour *Anticitrullinated Protein Antibodies*, cf. Fiche 4.8).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations particulières de prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les méthodes d'agglutination font appel aux propriétés agglutinantes des IgM anti-IgG. Ces IgG sont d'origine humaine ou animale dans les tests latex/Waaler-Rose, de turbidimétrie ou de néphélémétrie. Les tests ELISA et dérivés (FEIA, ALBIA) détectent les FR agglutinants ou non. Les IgG cibles sont là encore d'origine humaine ou animale. Quelle que soit l'origine de la cible antigénique, ces méthodes de dosage sont largement plus sensibles que les méthodes par agglutination. Il est possible de rechercher les FR d'isotypes différents des IgM. En pratique courante, l'intérêt des IgA ou IgG (FR « légers ») à activité FR est discuté.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles : latex/Waaler-Rose. Automatisées : turbidimétrie, néphélémétrie, fluorimétrie en flux (ALBIA). Automatisable : ELISA.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative (étalonnage international). Intégration du résultat quantitatif pour l'estimation du risque de polyarthrite rhumatoïde (cf. Synopsis III).
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances des tests</b>	Les méthodes de dosage des FR anti-IgG humaines sont décrites comme sensibles mais manquent de spécificité. Les méthodes de dosage des FR anti-IgG de lapin sont décrites comme spécifiques mais manquent de sensibilité. Un collège d'experts réunis par l'HAS en 2006 préconise l' <b>abandon des tests latex/Waaler-Rose</b> . Les performances des différentes troussees sont inégales.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Interférence des cryoglobulines, manque de spécificité.

## Fiche 4.8

**Anticorps anti-peptides ou protéines citrullinés (ACPA)****Signification biologique du paramètre**

La citrullination est un mécanisme physiologique lié à la transformation de l'arginine en citrulline par la peptidyl-arginine désaminase. Cette transformation moléculaire est observée au cours de différentes circonstances comme l'apoptose mais aussi l'inflammation (notamment au cours de la NETose, une forme particulière de mort cellulaire).

La signification physiopathologique de l'apparition des anticorps anti-peptides ou protéines citrullinés (ACPA, *Anti-Citrullinated Protein Antibodies*) reste mal comprise. Elle semble toutefois dépendante de deux facteurs : l'intoxication tabagique et la présence de groupes HLA à risque pour le développement de la polyarthrite rhumatoïde (PR) (HLA-DRB\*04 : 01, HLA-DRB\*04 : 04 et HLA-DRB\*04 : 05..., cf. Synopsis XIX).

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Les ACPA regroupent les anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (CCP, *Cyclic Citrullinated Peptides*) et les anticorps anti-ventine mutée et citrullinée (MCV). Ce sont des marqueurs biologiques très spécifiques de la PR. Leur présence est associée au risque érosif.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

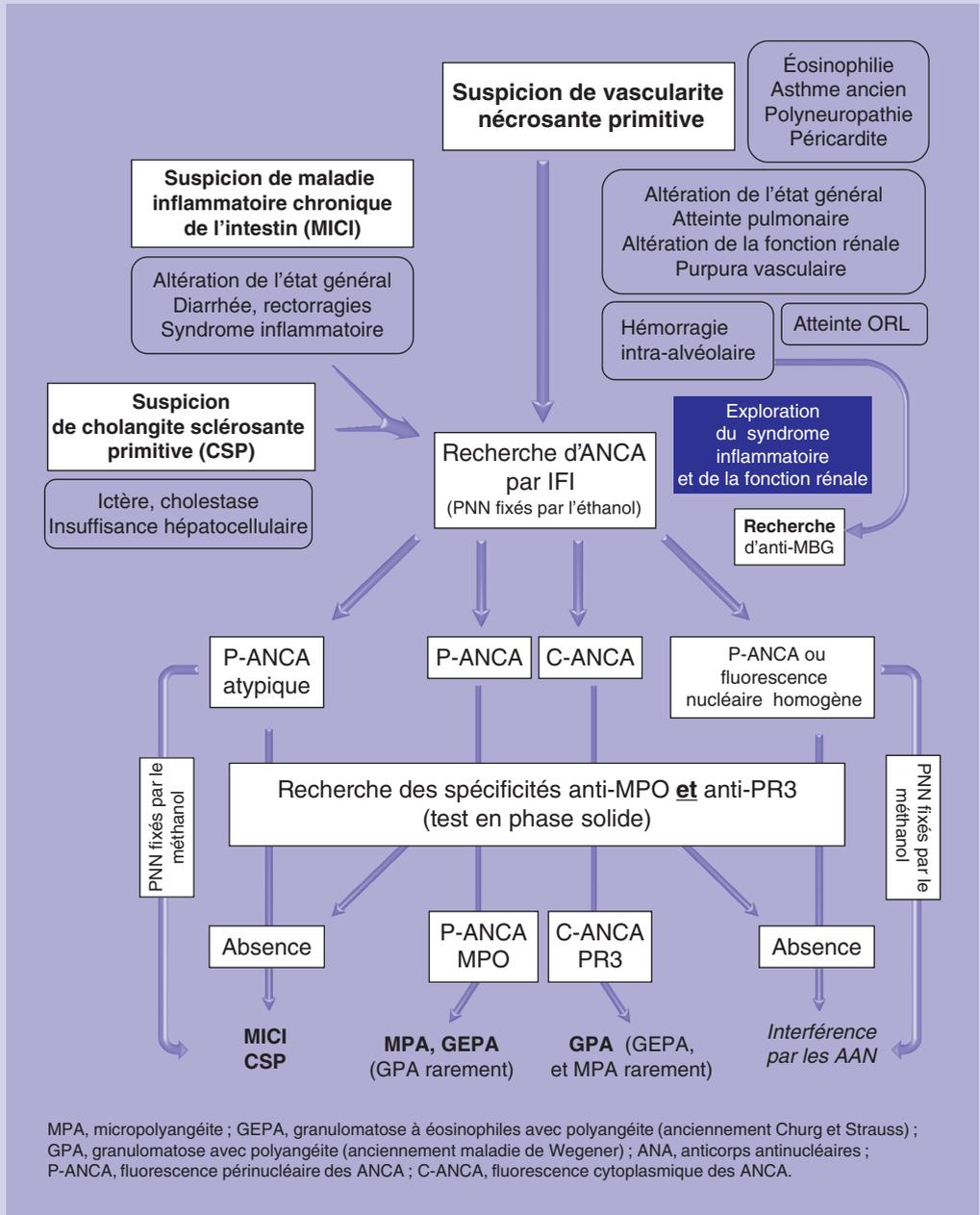
Dans le cadre du diagnostic biologique de la PR, les ACPA sont prescrits en première ligne et en combinaison avec les facteurs rhumatoïdes (FR) (cf. Fiche 4.7). Ils constituent les marqueurs diagnostiques les plus performants pour la PR.

Un titre élevé d'ACPA est décrit comme associé à une évolution plus agressive et cette notion est reprise dans les nouveaux critères de l'ACR EULAR 2010.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Immunodosages à réactifs marqués ELISA ou FEIA, ALBIA. On distingue les trousse dosant les anticorps anti-CCP dits de seconde et troisième génération et les trousse dosant les anticorps anti-MCV.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée (automate dédié) pour FEIA et ALBIA. Manuelle et automatisable pour l'ELISA.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative (unités arbitraires). Intégration du résultat quantifié pour l'estimation du risque de PR (cf. Synopsis III).
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances</b>	Les performances des trousse dosant les anti-CCP (2 ou 3) et anti-MCV sont globalement équivalentes. En pratique courante et selon l'expérience de l'utilisateur, il sera réalisé le dosage des anti-CCP ou des anti-MCV. Dans un souci d'économie de la santé, il ne semble pas pertinent de combiner systématiquement les deux tests.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité.

Synopsis IV

**Prescription des marqueurs associés aux vascularites et pathologies rénales auto-immunes**



## Fiche 4.9

## Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA)

### Signification biologique du paramètre

Les autoanticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA, pour *Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies*) sont dirigés principalement contre des enzymes intragranulaires : la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR3). Les aspects de fluorescence observés sur les polynucléaires neutrophiles (PNN) fixés par l'éthanol permettent de distinguer les C-ANCA (fluorescence cytoplasmique) et les P-ANCA (fluorescence périmucléaire).

Les ANCA sont observés au cours des vascularites et glomérulonéphrites.

L'utilisation de PNN humains permet également de révéler d'autres d'anticorps donnant une fluorescence nucléaire, de cible non encore identifiée, mais spécifiques de ces cellules. Ces anticorps sont associés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), aux cholangites sclérosantes primitives et à certaines hépatopathies. L'appellation P-ANCA « atypiques » n'est donc pas totalement appropriée même si elle a été retenue par le collège d'experts. Il a été proposé de les dénommer NANA pour *Nucleus-Associated Neutrophil Antibodies*. On parle aussi d'X-ANCA.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

À titre élevé et avec une spécificité identifiée anti-PR3 ou anti-MPO, les ANCA sont de bons marqueurs diagnostiques et évolutifs des vascularites nécrosantes primitives. Les C-ANCA de spécificité anti-PR3 sont le plus souvent associés à la granulomatose avec polyangéite (GPA, anciennement maladie de Wegener), les P-ANCA de spécificité anti-MPO à la micropolyangéite (MPA) et à la granulomatose éosinophile avec polyangéite (GPEA), anciennement syndrome de Churg et Strauss).

On décrit trois principales indications de recherche des ANCA. La première est un diagnostic d'urgence pour l'évaluation de la mise en jeu du pronostic vital par hémorragie intra-alvéolaire massive. La seconde est l'évaluation du pronostic fonctionnel d'une glomérulonéphrite rapidement progressive. La troisième est le bilan diagnostique de manifestations cliniques évoquant une vascularite nécrosante primitive (altération de l'état général, manifestations rénales, articulaires, sinusiennes, pulmonaires, cutanées...). Les cliniciens ont l'habitude de suivre les titres des ANCA, bien que leur décroissance voire leur disparition ne soit pas associée à l'absence de risque de récurrence.

La recherche d'ANCA s'inscrit également dans le cadre du diagnostic des MICI. Associés à la recherche des anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA, cf. Fiche 5.11), ils peuvent orienter le diagnostic des colites inclassées. La rectocolite hémorragique (RCH) s'associe à la présence de P-ANCA atypiques et à l'absence d'ASCA. La maladie de Crohn s'associe à la présence d'ASCA le plus souvent en l'absence de P-ANCA atypiques.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche d'ANCA s'inscrit en première intention dans le cadre de la prise en charge des vascularites et des glomérulonéphrites. La prescription des ANCA dans le cadre des MICI ne s'inscrit qu'en seconde intention, quand les données histologiques ne permettent pas de trancher entre maladie de Crohn et RCH.

L'IFI est l'examen de première intention obligatoire. En cas de positivité de ce test de dépistage, la recherche des deux spécificités de pertinence clinique pour les vascularites nécrosantes primitives (anti-PR3 et anti-MPO) doit obligatoirement être faite.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Éviter une décantation retardée pour limiter l'activation des polynucléaires neutrophiles qui risque de conduire à une adsorption des ANCA.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	La détection des ANCA fait appel à une combinaison de tests d'immunofluorescence indirecte (IFI) et de tests en phase solide. L'IFI est réalisée sur PNN humains fixés à l'éthanol, qui permet d'observer les trois aspects de fluorescence : cytoplasmique (C-ANCA), périnucléaire (P-ANCA) et atypique. L'utilisation d'autres fixateurs (formol et méthanol) permet de distinguer notamment les P-ANCA de spécificité anti-MPO (cytoplasmiques après fixation au formol) des anticorps antinucléaires, ou d'orienter vers la présence de NANA (persistance après fixation au méthanol). Il peut être utile d'éliminer la présence d'anticorps antinucléaires sur cellules HEP-2 (cf. <a href="#">Fiche 4.1</a> ). La spécificité des ANCA est identifiée par des tests ELISA, d'immunodot, de chimioluminescence (CLIA) et ALBIA. Seule la recherche d'ANCA d'isotype IgG peut être réalisée avec les coffrets commerciaux.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable pour IFI, ELISA, ALBIA, dots. Automatisée pour FEIA et CLIA.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables pour l'IFI et l'immunodot. Quantitative pour les méthodes ELISA et ALBIA.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Spécificité : supérieure à 95 % quand IFI et tests en phase solide sont associés. Sensibilité : elle varie selon les pathologies et les types d'anticorps : – GPA (Wegener) : C-ANCA PR3 : 65 %/P-ANCA MPO : 25 % ; – GEPA (Churg et Strauss) : P-ANCA MPO : 60 %/C-ANCA PR3 : 10 % ; – MPA : P-ANCA MPO : 58 %/C-ANCA PR3 : 26 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	On observe des ANCA à titre faible, parfois de spécificité anti-MPO, mais le plus souvent dirigés contre des antigènes mineurs (élastase, cathepsine, azurocidine, <i>Bactericidal Permeability Increasing Factor</i> ou BPI) ou de spécificité indéterminée, dans un éventail large de maladies à composante inflammatoire chronique, avec ou sans signe de vascularite. Certains coffrets révèlent des anticorps anti-PR3 dans le cadre de RCH, alors que l'aspect de fluorescence sur PNN évoque des P-ANCA atypiques (NANA). Il existe des interférences avec les anticorps ciblant des antigènes cytoplasmiques (ribosomes, actine...), ainsi qu'en cas d'hypergammaglobulinémie. Des faux positifs sont décrits avec les tests en phase solide pour les anticorps anti-MPO liés à la présence de complexes ADN/anti-ADN. Il existe des différences de sensibilité et de spécificité entre les tests ELISA, dépendant de l'utilisation de protéine PR3 native ou recombinante. L'interprétation des résultats est délicate lorsque plusieurs spécificités sont identifiées en même temps. Elle dépend dans tous les cas de l'expertise du lecteur. Il faut souligner le manque de standardisation inter-essais et préconiser le suivi dans le même laboratoire.

## Fiche 4.10

### **Anticorps anti-membrane basale glomérulaire (anti-MBG)**

#### Signification biologique du paramètre

Les autoanticorps anti-membrane basale glomérulaire (anti-MBG) sont dirigés contre un épitope situé sur le premier domaine non collagène de la chaîne alpha 3 du collagène de type IV [NC1 $\alpha$ 3(IV)]. Ces anticorps sont responsables d'une glomérulonéphrite rapidement progressive qui peut mettre en jeu le pronostic fonctionnel rénal. Il peut s'y associer une hémorragie intra-alvéolaire réalisant le tableau de syndrome pneumo-rénal, communément appelé syndrome de Goodpasture, qui peut mettre en jeu le pronostic vital. La mise en route du traitement dépend de la rapidité du diagnostic et il s'agit donc d'un examen d'urgence. Dans près d'un tiers des cas, les patients avec anticorps anti-MBG ont aussi des ANCA, ce qui justifie la recherche simultanée de ces deux autoanticorps.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dépistage et la quantification des anticorps anti-MBG visent à poser le diagnostic et évaluer le

pronostic fonctionnel en cas de glomérulonéphrite rapidement progressive. En raison de leur forte valeur prédictive positive, la recherche des anticorps anti-MBG est particulièrement recommandée devant toute insuffisance rénale avec microhématurie d'origine indéterminée et d'évolution rapide. C'est également un élément du bilan diagnostique de manifestations cliniques évoquant un syndrome pneumo-rénal. À noter que les cliniciens ont l'habitude de suivre les titres des anticorps anti-MBG, bien que leur décroissance voire leur disparition n'exclue pas un risque de récurrence.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche des anti-MBG est un examen de première intention à caractère d'urgence. Il est utile de confronter les résultats à ceux de l'examen anatomopathologique de la ponction-biopsie rénale quand elle a pu être réalisée.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	L'IFI sur coupe de rein de primate supérieur est la méthode de référence, mais la lecture des lames nécessite une expertise. Des anticorps de titre faible peuvent ne pas être correctement identifiés par l'IFI et il est donc souhaitable d'effectuer également une recherche en phase solide (ELISA, FEIA, ALBIA, CLIA, immunodot), notamment en urgence. Certains tests en phase solide associent les spécificités MBG, PR3 et MPO.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable pour IFI, ELISA, ALBIA, dots. Automatisé pour FEIA, CLIA.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables pour l'IFI et l'immunodot. Quantitative pour ELISA, FEIA, ALBIA et CLIA.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La spécificité des anticorps anti-MBG est excellente, à 99,7 % et ils ont une forte valeur prédictive positive (87,2 %).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	L'IFI manque de sensibilité pour les anticorps de titre faible. Les différences de sensibilités et de spécificités entre les tests en phase solide dépendent de l'utilisation de protéine native ou recombinante. Il existe une phase seronégative en début de maladie (anticorps fixés dans le rein) justifiant la répétition du test.

## Fiche 4.11

## Anticorps anti-récepteur de la phospholipase A2 (anti-PLA2-R)

### Signification biologique du paramètre

Les autoanticorps dirigés contre le récepteur de la phospholipase A2 (anti-PLA2-R), décrits en 2009, reconnaissent un antigène membranaire ubiquitaire notamment présent sur les podocytes.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les anti-PLA2-R présentent une excellente valeur diagnostique dans la glomérulonéphrite extramembraneuse idiopathique (GEMi). Ils sont absents dans les GEM secondaires et dans les autres néphropathies protéinuriques. Il existe une corrélation entre le titre de ces anticorps, une maladie cliniquement active avec protéinurie et hypoalbuminémie, et la réponse aux traitements immunosuppresseurs.

Chez les transplantés rénaux, la présence d'anticorps anti-PLA2-R pourrait être un facteur de risque de récurrence de la maladie. Ces anticorps sont absents dans les GEM *de novo*.

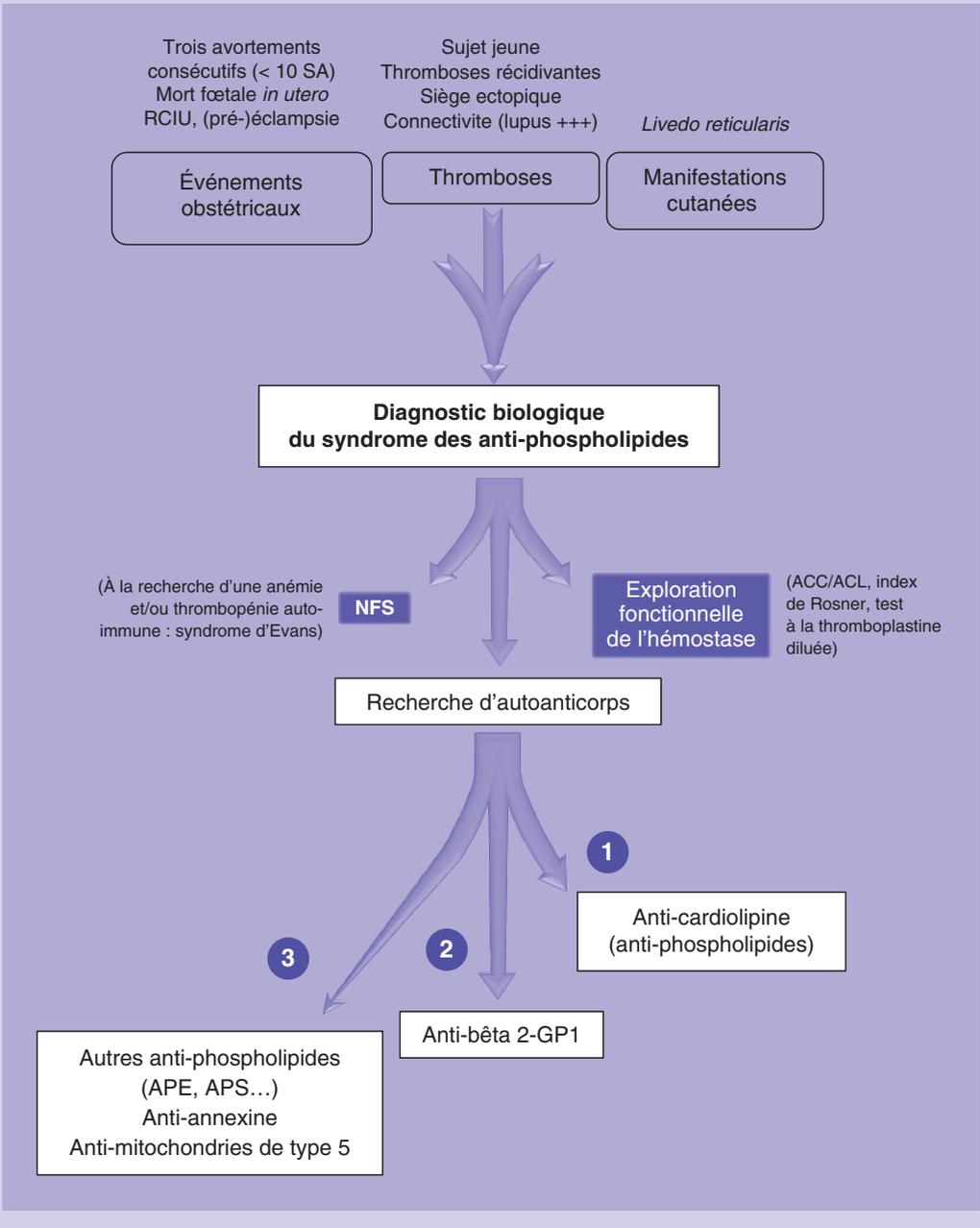
### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche d'anticorps anti-PLA2-R est un examen de première intention qui permet d'affirmer le caractère idiopathique d'une GEM et de suivre l'activité de la maladie. Le taux des anticorps permet de prédire la réponse au traitement immunosuppresseur. Chez les patients en rémission clinique, les anticorps anti-PLA2-R disparaissent avant la protéinurie et réapparaissent en cas de récurrence.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	L'IFI sur cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) transfectées par le gène du PLA2-R et cellules témoins de transfection est la technique disponible pour le dépistage et le titrage dans les laboratoires spécialisés.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables (titration).
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Les sensibilités et spécificités cliniques rapportées dans le diagnostic de la GEMi respectivement de 50–80 % et 90–100 %. Chez les patients traités pour une GEMi et présentant une protéinurie < 3 g/24 heures la prévalence du marqueur est faible (15 %). Après transplantation rénale, la prévalence des anticorps anti-PLA2-R est de 50 % en cas de récurrence de la maladie <i>versus</i> 0 % en l'absence de récurrence.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularités.

Synopsis V

**Prescription des marqueurs biologiques du syndrome des anti-phospholipides**



## Fiche 4.12

### **Anticorps anti-phospholipides de type cardiolipine (ACL)**

#### **Signification biologique du paramètre**

Les anticorps anti-phospholipides (APL) sont dirigés contre différentes molécules dont la plus pertinente est la cardiolipine (ACL), couplée au cofacteur bêta 2 glycoprotéine 1 (B2GPI) (cf. Fiche 4.13). Il existe également des anticorps dirigés contre la phosphatidylsérine, la phosphorylcholine, le phosphatidylinostol, la phosphatidyléthanolamine. Les ACL sont caractéristiques du syndrome des anti-phospholipides (SAPL) et sont présents chez 85 % des patients.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dépistage et la quantification des ACL sont proposés dans le cadre du bilan de thrombophilie et de fausses couches à répétition. Un résultat positif à deux reprises à 12 semaines d'intervalle est considéré comme un marqueur biologique de SAPL. En phase diagnostique, ce dosage permet l'évaluation du risque de thrombose chez un sujet

à risque (connectivite, lupus érythémateux systémique) et le bilan de manifestations cliniques évoquant un SAPL (thrombose de site ectopique, sujet jeune, récidivante... ; manifestations obstétricales). En phase de suivi, les cliniciens peuvent avoir l'habitude de suivre les titres des APL, bien que leur décroissance voire leur disparition n'élimine pas le risque de récurrence de thrombose.

On rappellera que les critères de Sapporo sont des critères de classification et non des critères diagnostiques.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Le dosage des IgG ACL est proposé en première intention. L'intérêt du dosage des IgM ACL est discuté du fait du manque de spécificité de ce paramètre qui peut être proposé en seconde intention. Il n'est plus nécessaire de rechercher une sérologie syphilitique dissociée (VDRL) car ce test est redondant et peu spécifique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Recherche d'IgG ( $\pm$ IgM/IgA) en ELISA, ALBIA, FEIA, immunodot.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable pour ELISA et immunodot. Automatisée pour FEIA et ALBIA.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative ou qualitative à données quantifiables pour l'immunodot.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La spécificité et la sensibilité de la recherche des ACL dépendent des coffrets. Certains proposent des mélanges de phospholipides mais ils manquent de spécificité pour le diagnostic du SAPL. Les IgG ACL de titres élevés ont une bonne spécificité, supérieure à celle des IgG ACL de titres faibles. La présence conjointe d'ACL et d'anticorps anti-B2GP1 augmente la valeur diagnostique pour le SAPL. Tout résultat positif d'ACL justifie donc d'un dosage d'anticorps anti-B2GP1. L'intérêt de la recherche des IgM et IgA ACL est discuté. La spécificité des IgM ACL est toutefois meilleure que celle des APL.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	En raison du manque de standardisation inter-essais, il est recommandé de réaliser le second dosage dans le même laboratoire. En phase diagnostique (sujets non traités), les taux inférieurs à 2 ou 3 fois le seuil fournisseur peuvent être liés à une interférence : infections (VIH...) ou prise médicamenteuse. Sous traitement hypocoagulant, les titres des anticorps peuvent baisser et même passer sous le seuil de détection. Enfin, il existe de véritables SAPL sans marqueurs sérologiques classiques (cf. <a href="#">Fiche 4.14</a> ).

## Fiche 4.13

### Anticorps anti-bêta 2-glycoprotéine 1 (B2GP1)

#### Signification biologique du paramètre

La bêta 2-glycoprotéine 1 (B2GP1, ou apolipoprotéine H) est une protéine circulante aux propriétés hypocoagulantes. Elle s'associe aux phospholipides et, dans cette conformation, peut devenir la cible d'autoanticorps. La présence d'anticorps anti-B2GP1 est jugée comme augmentant le risque thrombogène chez un individu présentant des anticorps anti-phospholipides de type cardiolipine (ACL).

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dépistage et la quantification des anti-B2GP1 s'inscrivent dans le bilan de thrombophilie et de fausses couches à répétition. Un résultat positif à deux reprises à 12 semaines d'intervalle est considéré comme un marqueur biologique de SAPL. Toutefois, le dosage des anti-B2GP1 ne doit pas être proposé seul car il est moins sensible que celui

des ACL. En phase diagnostique, ce dosage permet l'évaluation du risque de thrombose chez un sujet à risque (connectivite, lupus érythémateux systémique) et le bilan de manifestations cliniques évoquant un SAPL (thrombose de site ectopique, récidivante, sujet jeune..., manifestations obstétricales). En phase de suivi, les cliniciens peuvent avoir l'habitude de suivre les titres des APL, bien que leur décroissance voire leur disparition n'élimine pas le risque de récurrence de thrombose.

On rappellera que les critères de Sapporo sont des critères de *classification* et non des critères diagnostiques.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le dosage des anticorps anti-B2GP1 peut être proposé en première intention associé à celui des ACL dans un contexte clinique de SAPL, ou en seconde intention en cas de positivité des ACL (cf. [Fiche 4.12](#)).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Recherche d'IgG et IgM ( $\pm$ IgA) en ELISA, ALBIA, FEIA, immunodot.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable pour l'ELISA et l'immunodot. Automatisée pour FEIA et ALBIA.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances</b>	Le dosage des anti-B2GP1 est moins sensible que le dosage des ACL. La présence conjointe d'ACL et d'anticorps anti-B2GP1 augmente la valeur diagnostique pour le SAPL. Il existe des tests identifiant séparément les isotypes IgG, les IgM (voire les IgA) anti-B2GP1 et des tests dits de « dépistage » (recherchant simultanément la présence d'un de ces trois isotypes ou de plusieurs d'entre eux de façon simultanée). IgG et IgM anti-B2GP1 auraient les mêmes valeurs diagnostiques. L'intérêt des IgA anti-B2GP1 n'est pas définitivement établi.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	En raison du manque de standardisation inter-essais, il est recommandé de réaliser le second dosage dans le même laboratoire. En phase diagnostique (sujets non traités), les taux inférieurs à 2 ou 3 fois le seuil fournisseur peuvent être liés à une interférence : infections (VIH...) ou prise médicamenteuse. Sous traitement hypocoagulant, les titres des anticorps peuvent baisser et même passer sous le seuil de détection. Enfin, il existe de véritables SAPL sans marqueurs sérologiques classiques (cf. <a href="#">Fiche 4.14</a> ).

## Fiche 4.14

**Anticorps anti-mitochondries de type 5 (M5)****Signification biologique du paramètre**

Les anticorps anti-mitochondries de type 5 (M5) sont associés au syndrome des anti-phospholipides. Leur cible n'est pas précisément identifiée.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Il est rapporté que 15 à 20 % des SAPL cliniques restent muets sur le plan biologique. L'identification d'anticorps anti-mitochondries de type 5 peut conduire au diagnostic de SAPL séronégatif.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

La détection d'anticorps anti-mitochondries de type 5 s'inscrit en troisième intention quand le contexte clinique évoque un SAPL sans marqueur biologique. Bien que rares, leur grande spécificité pour le SAPL justifie leur recherche. En pratique courante peu de laboratoires effectuent l'identification de cette spécificité.

Les anticorps anti-M5 sont le plus souvent découverts fortuitement lors de la recherche d'autres autoanticorps en IFI sur triple substrat. On peut lui préférer la recherche d'anticorps anti-phosphatidyl-léthanolamine ou phosphatidyl-sérine (cf. [Fiche 4.15](#)), même si le nombre de centres recherchant ces spécificités reste là aussi limité.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les anticorps anti-M5 sont révélés par immunofluorescence indirecte sur triple substrat (estomac, rein et foie) de rat ou de souris.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle semi-automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Aucune donnée récente n'est publiée sur la recherche de ces anticorps très rares. La technique manque de sensibilité mais a une grande spécificité. Son intérêt réside dans la découverte fortuite de cette spécificité lors de la lecture du triple substrat.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité.

## Fiche 4.15

## Anticorps anti-phospholipides autres que les anticorps anti-cardiolipine

### Signification biologique du paramètre

Les anticorps anti-phospholipides (APL) sont dirigés contre différentes molécules dont la plus pertinente est la cardiolipine (ACL) (cf. Fiche 4.12). Il existe également des anticorps dirigés contre la phosphatidylsérine, la phosphorylcholine, le phosphatidylinostol, la phosphatidyléthanolamine au cours du SAPL. Leur recherche peut être intéressante en l'absence de marqueurs conventionnels alors que le contexte clinique est évocateur (on parle de SNAPS, pour *Seronegative Antiphospholipid Syndrome*).

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dépistage et la quantification des APL sont proposés dans le cadre du bilan de thrombophilie et de fausses couches à répétition quand les ACL

et anti-B2GP1 sont négatifs. Un résultat positif à deux reprises à 12 semaines d'intervalle est considéré comme un marqueur biologique de SAPL (thrombose de site ectopique, récidivante, sujet jeune..., manifestations obstétricales). En phase de suivi, la décroissance voire la disparition n'élimine pas le risque de récurrence de thrombose.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ces tests ne s'inscrivent *qu'en troisième intention*, devant des résultats négatifs d'IgG et IgM anti-cardiolipine et anti-B2GP1 mais également anti-coagulant circulant (anti-coagulant lupique ou anti-prothrombinase) dans un contexte clinique évocateur de SAPL. La recherche d'IgM anti-phosphatidyléthanolamine peut être particulièrement recommandée dans le cadre des SAPL obstétricaux.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA (maison ou commerciaux), immunodots.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles ou automatisables.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative ou qualitative à données quantifiables pour l'immunodot.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Dans la littérature, environ 20 % des patients présentant un SAPL clinique sans marqueur conventionnel (ACL et/ou anti-B2GP1) auraient des anticorps anti-phospholipides non ACL. Les performances des coffrets commerciaux restent à évaluer.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Manque de standardisation inter-essais : préciser le second dosage dans le même laboratoire. La présence d'APE dans le lupus érythémateux systémique (environ 70 % des patients) est sans corrélation avec le risque de thrombose.

## Fiche 4.16

**Anticorps anti-annexine V (IgG et IgM)****Signification biologique du paramètre**

L'annexine V est une protéine calcium-dépendante qui a une forte affinité pour les phospholipides anioniques. *In vitro*, c'est un puissant anticoagulant. La présence d'anticorps anti-annexine V a été décrite comme un facteur de risque de thrombose.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dépistage et la quantification des anticorps anti-annexine V sont proposés dans le cadre du bilan de thrombophilie et de fausses couches à répétition. Un résultat positif à deux reprises à 12 semaines d'intervalle est considéré comme un marqueur biologique

de SAPL (thrombose de site ectopique, récidivante, sujet jeune..., manifestations obstétricales).

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce test ne s'inscrit qu'en troisième intention, devant des résultats négatifs d'anticorps anti-cardiolipine et anti-B2GP1 (voire anti-APE ou APS) (cf. [Fiches 4.12 à 4.15](#)) dans un contexte clinique pourtant évocateur de SAPL obstétrical. Il faut noter que peu de sociétés commerciales proposent des coffrets de réactifs. Certains laboratoires universitaires proposent des tests maison.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Test ELISA.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative. En raison du manque de standardisation inter-essais, préconiser le second dosage dans le même laboratoire.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Dix à 20 % des patients présentant un SAPL clinique sans marqueur conventionnel (ACL et/ou anti-B2GP1) présenteraient des anticorps anti-annexine V.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité. Très peu de laboratoires réalisent ce dosage. Il est à réserver à des centres experts dans la prise en charge du syndrome des anti-phospholipides.

## Bibliographie du chapitre 4

FICHE 4.1 – Anticorps antinucléaires : recherche et titrage par IFI sur cellules HEp-2

Damoiseaux JGMC, et al. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev* 2006; 5 : 10–7.

Goetz J. Conduite à tenir devant la mise en évidence d'anticorps antinucléaires sur HEp-2. *RFL* 2012; 444 : 7–11.

Wiik AS. Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HE-p2 cells. *J Autoimmun* 2010; 35 : 276–90.

FICHE 4.2 – Anticorps anti-ADN double brin

Chrétien P. Les anticorps anti-ADN. *RFL* 2012; 41 : 16–7.

Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 53 : 424–9.

Feltkamp TE, et al. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. *Ann Rheum Dis* 1988; 47 : 740–6.

Launay D, et al. Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and *Cribridia luciliae* immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta* 2010; 411 : 959–64.

Smeenk RJT, et al. A comparison of assays used for the detection of antibodies to DNA. *Clin Rheumatol* 1990; 9 : 63–73.

FICHE 4.3 – Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

Damoiseaux JGMC, et al. From ANA to ENA : how to proceed? *Autoimmun Rev* 2006; 5 : 10–7.

Goetz J. Conduite à tenir devant la mise en évidence d'anticorps antinucléaires sur Hep-2. *RFL* 2012; 444 : 7–11.

Lock RJ, et al. Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift affected clinical interpretation? *J Clin Pathol* 2001; 54 : 187–90.

FICHE 4.4 – Anticorps anti-nucléosomes

Bizzaro N, et al. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. *Autoimmun Rev* 2012; 12 : 97–106.

Gomez JA, et al. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value. *Autoimmun Rev* 2008; 7 : 606–11.

Villalta D, et al. Anti-chromatin (nucleosome) autoantibodies. In : Shoenfeld Y, Meroni PL, Gershwin E, editors. *Autoantibodies*. 2<sup>e</sup> ed Elsevier; 2007. p. 141–9.

FICHE 4.5 – Anticorps anti-histones

Chevallier A, et al. Dépistage des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires insolubles : anti-nucléosome, anti-ADN natif et anti-histones. *RFL* 2006; 384 : 51–8.

Dumortier H, et al. Histone autoantibodies. In : Shoenfeld Y, Meroni PL, Gershwin E, editors. *Autoantibodies*. 2<sup>e</sup> ed Elsevier; 2007. p. 169–76.

FICHE 4.6 – Autoanticorps associés à la sclérodémie systémique autres que les anti-centromère et anti-ADN-topoisomérase 1 (Scl70)

Bonroy C, et al. Optimization and diagnostic performance of a single multiparameter lineblot in the serological workup of systemic sclerosis. *J Immunol Methods* 2012; 379 : 53–60.

Emilie S, et al. Anti-RNAP3 antibodies are associated with scleroderma renal crisis in a French cohort. *Scand J Rheumatol* 2011; 40 : 404–6.

Hamaguchi Y, et al. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 2010; 37 : 42–53.

Mierau R, et al. Frequency of disease associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Res Ther* 2011; 13 : R172.

FICHE 4.7 – Facteurs rhumatoïdes (FR)

2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62 : 2569–81.

Nishimura K, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; 146 : 797–808.

FICHE 4.8 – Anticorps anti-peptides ou protéines citrullinées

2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62 : 2569–81.

Luime JJ, et al. Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review. *Ann Rheum Dis* 2010; 69 : 337–44.

Nishimura K, et al. Meta-analysis : diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007; 146 : 797–808.

FICHE 4.9 – Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA)

2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthr Rheum*, 65; 2013 : 1–11.

Beauvillain C, et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how should the biologist manage them? *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 35 : 47–58.

FICHE 4.10 – Anticorps anti-membrane basale glomérulaire (anti-MBG)

2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65 : 1–11.

Hellmark T, et al. Glomerular basement autoantibodies. In : Shoenfeld Y, Meroni PL, Gershwin E, editors. *Autoantibodies*. 2<sup>e</sup> ed Elsevier; 2007. p. 553–9.

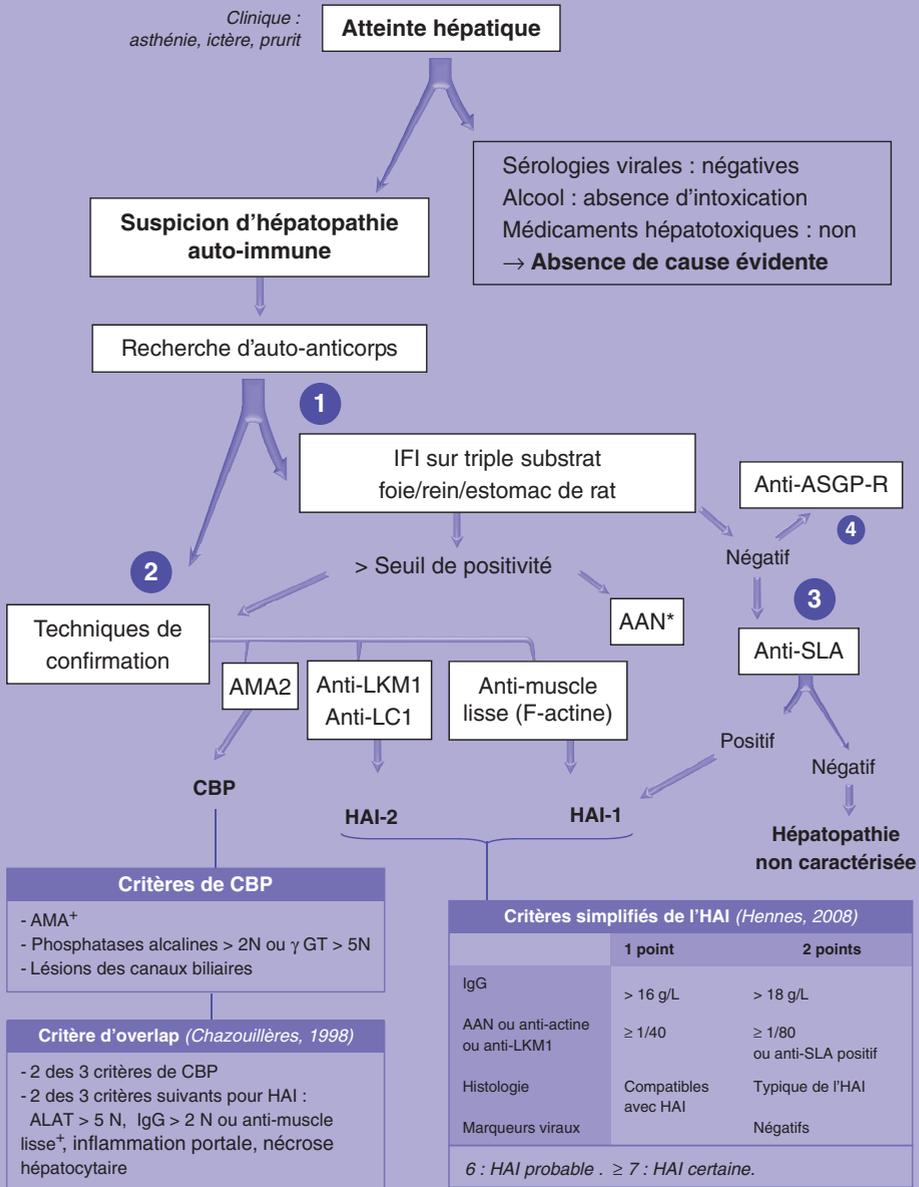
- McAdoo SP, et al. Novel forms of clinical vasculitis: Anti-GBM vasculitis (Goodpasture's disease). *Presse Med* 2013; 42 : 625–8.
- Westman KW, et al. Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA. An important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 : 1863–8.
- FICHE 4.11 – Anticorps anti-récepteur de la phospholipase A2 (anti-PLA2-R)
- Beck Jr LH, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Eng J Med* 2009; 361 : 11–21.
- Debiec H, et al. Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and de novo membranous nephropathy. *Am J Transplant* 2011; 11 : 214–25.
- Hoxha E, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A-2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 : 2526–32.
- FICHE 4.12 – Anticorps anti-phospholipides de type cardiolipine (ACL)
- Devreese K, et al. Challenges in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Clin Chem* 2010; 56 : 930–40.
- Devreese K. Standardization of antiphospholipid antibody assays. Where do we stand? *Lupus* 2012; 21 : 718–21.
- FICHE 4.13 – Anticorps anti-bêta 2-glycoprotéine 1 (B2GP1)
- Piette J-C. Towards improved criteria for the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1998; 7 : S149–57.
- Sciascia S, et al. Clinical accuracy for diagnosis of antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus: evaluation of 23 possible combinations of antiphospholipid antibody specificities. *J Thromb Haemost* 2012; 10 : 2512–8.
- Willis R, et al. Anti-β2-glycoprotein I antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1285 : 44–58.
- FICHE 4.14 – Anticorps anti-mitochondries de type 5 (M5)
- Andrejevic S, et al. Clinical and serological follow-up of 71 patients with anti-mitochondrial type 5 antibodies. *Lupus* 2007; 16 : 788–93.
- Johanet C, et al. Syndrome des antiphospholipides. In : *Fausse couches et mort foetales*. Paris : Masson; 2007. p. 62–72.
- FICHE 4.15 – Anticorps anti-phospholipides autres que les anticorps anti-cardiolipine
- Alessandri C, et al. New autoantigens in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2011; 10 : 609–16.
- Nayfe R, et al. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Rheumatology*. 2013; 52 : 1358–67.
- Sanmarco M. Clinical significance of antiphosphatidylethanolamine antibodies in the so-called “seronegative antiphospholipid syndrome” *Autoimmun Rev* 2009; 9 : 90–2.
- Staub HL, et al. Anti-phosphatidylethanolamine antibody, thromboembolic events and the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev* 2012; 12 : 230–4.
- FICHE 4.16 – Anticorps anti-annexine V (IgG et IgM)
- Iaccarino L, et al. Anti-annexins autoantibodies : their role as biomarkers of auto-immune diseases. *Autoimmun Rev* 2011; 10 : 553–8.

# Chapitre 5

## **Exploration des hépatopathies et maladies digestives**

Synopsis VI

Prescription des autoanticorps associés aux hépatopathies



\* Cf. Fiche 5.1. CBP, cirrhose biliaire primitive ; HAI, hépatite auto-immune ; AMA2, anticorps anti-mitochondries de type 2 ; LKM, Liver Kidney Microsome ; LC1, Liver Cytosol ; SLA, Soluble Liver Antigen ; ASGP-R, récepteur de l'asialoprotéine ; AAN, anticorps antinucléaires.

## Fiche 5.1

### Anticorps antinucléaires associés aux hépatopathies auto-immunes

#### Signification biologique du paramètre

Les anticorps antinucléaires (ANA) ont été inclus dans les critères diagnostiques adoptés par le Groupe international des hépatites auto-immunes (HAI) en 1999 et en 2008. La présence de ces anticorps, souvent associés aux anticorps anti-muscle lisse, est à l'origine de la classification des HAI, les ANA étant un marqueur diagnostique des HAI de type 1 (HAI-1).

Dans la cirrhose biliaire primitive (CBP), différents ANA ont été identifiés pour leur intérêt diagnostique, les anti-gp210 qui donnent en immunofluorescence indirecte un aspect de type « membrane nucléaire » et les anti-Sp100 et anti-PML (*Promyelocytic Leukemia*) qui donnent un aspect de type « moucheté à grains nucléaires multiples » (ponctuations nucléaires à plus de six grains, ou *multiple nuclear dots* ou *nuclear bodies*).

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les ANA sont présents dans plus de 70 % des HAI-1, isolés chez 15 % des patients et associés aux anticorps anti-muscle lisse chez 60 % d'entre eux, mais sont peu spécifiques. Leurs cibles antigéniques sont nombreuses et mal caractérisées. Les anticorps les plus intéressants sont les anti-ADN double brin (ADNdb) (cf. Fiche 4.2), présents dans 25 % des HAI-1 avec ANA et dans 30 à 60 % des formes mixtes (CBP/HAI). L'association

anticorps anti-mitochondries de type 2 (AMA-2) et anti-ADNdb semble spécifique de ces formes mixtes. La CBP est associée chez 95 % des patients à la présence d'anticorps AMA-2. Certains anticorps antinucléaires ont cependant leur place dans le bilan diagnostique des CBP :

- les anti-gp210 qui reconnaissent une protéine du pore de la membrane nucléaire sont un marqueur diagnostique et pronostique de la CBP ; ils sont en effet associés à des formes évoluant plus volontiers vers l'insuffisance hépatocellulaire ;
- les anti-Sp100 et anti-PML reconnaissent une protéine des *nuclear bodies*, ou *PML bodies*, et sont un marqueur diagnostique de la CBP mais non spécifique car décrit au cours d'autres maladies auto-immunes.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ces spécificités sont recherchées en seconde intention, après l'immunofluorescence sur HEp-2 (cf. Fiche 4.1) ou triple substrat (cf. Fiche 5.2) et devant un aspect évocateur. Les anticorps anti-gp210 et les anti-Sp100 sont recherchés en cas de suspicion de CBP, en particulier si la recherche des AMA-2 est négative (cf. Fiche 4.2), et en cas d'ANA positifs donnant un aspect évocateur. Les anticorps anti-ADNdb sont recherchés en cas de suspicion d'HAI avec ANA donnant une fluorescence homogène (cf. Fiches 4.2 et 4.3).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Immunofluorescence indirecte (IFI) pour les ANA sur HEP-2 ou sur triple substrat, ELISA, immunodots/immunolines. Les antigènes utilisés sont le plus souvent des protéines recombinantes pour ces deux dernières techniques.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisable pour l'IFI et l'immunodot. Manuelle ou automatisable pour l'ELISA.
<b>Type de mesure</b>	IFI : qualitative avec titration. ELISA : quantitative. Immunodot : qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison (anti-gp210 et Sp100) ; commercial (anti-ADNdb).
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Valeur diagnostique pour la CBP des anti-gp210 (sensibilité 9,4 à 41,2 %) retrouvés dans 15 à 47 % des CBP sans anti-mitochondries. La spécificité est excellente (> 96 %). Pour la CBP, les anti-Sp100 ont une sensibilité de 13 à 44 %, mais spécificité moins bonne que celle des anti-gp210. Valeur diagnostique pour les formes mixtes des anti-ADNdb associés aux AMA-2.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité.

## Fiche 5.2

### Anticorps anti-mitochondries, anti-LKM1, anti-cytosol, anti-muscle lisse et anti-F-actine

#### Signification biologique du paramètre

Les autoanticorps anti-mitochondries de type 2 (ou AMA-2), anti-réticulum endoplasmique (ou anti-LKM, *Liver Kidney Microsomes*), anti-cytosol hépatique (ou anti-LC1), anti-muscle lisse constituent des marqueurs essentiels pour le diagnostic des hépatopathies auto-immunes que sont la cirrhose biliaire primitive (CBP), les hépatites auto-immunes de type 1 et 2 (HAI-1, HAI-2) et les formes mixtes (*overlap syndrome* CBP/HAI). Si ces autoanticorps sont partie intégrante des critères diagnostiques de ces maladies, leur rôle exact dans la pathogénie reste à définir puisque l'hypothèse d'une cytotoxicité à médiation cellulaire est généralement admise. Les AMA-2 reconnaissent un ensemble de molécules appartenant à la famille des 2-oxo-acide déshydrogénases, protéines localisées sur la membrane interne de la mitochondrie. La protéine E2 du complexe de la pyruvate déshydrogénase constitue l'autoantigène prédominant. Les anticorps anti-LKM1 reconnaissent le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6), enzyme de détoxification qui intervient dans le métabolisme de nombreux médicaments. Les anticorps anti-LC1 reconnaissent une enzyme du métabolisme de l'histidine, la formiminotransférase cyclodésaminase.

D'un point de vue pratique, la présence de ces autoanticorps ne signifie pas nécessairement l'existence d'une hépatopathie auto-immune. Ils peuvent également s'observer dans des pathologies hépatiques non auto-immunes, telles que les hépatites médicamenteuses, les hépatites virales (notamment l'hépatite C) ou lors d'un rejet d'allogreffe hépatique.

Les anticorps antinucléaires associés aux hépatopathies auto-immunes font l'objet de la [Fiche 5.1](#).

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les AMA-2 restent le meilleur marqueur de la CBP. Ils permettent le diagnostic différentiel entre CBP et

autres cholestases intra-hépatiques, et peuvent être détectés très précocement dans les formes asymptomatiques de la maladie. Leur spécificité est très élevée; on peut néanmoins les observer de façon exceptionnelle dans d'autres pathologies comme les affections auto-immunes associées à la CBP (sclérodermies, syndrome de Gougerot-Sjögren, thyroïdite d'Hashimoto), des maladies inflammatoires comme la sarcoïdose, quelques cas d'hémopathies ou d'hépatite virale C. Chez l'enfant, la présence d'AMA-2 est rarissime mais constitue un marqueur d'HAI. Ces anticorps n'ont pas de valeur pronostique ni d'intérêt pour le suivi de la maladie.

Les anticorps anti-LKM1 et les anticorps anti-LC1 sont les deux marqueurs diagnostiques de l'HAI-2, qui est essentiellement pédiatrique et plus rare que l'HAI-1. La présence d'anti-LKM1 est l'élément diagnostique principal de l'HAI-2. Les anticorps anti-LC1, bien que principalement associés aux anticorps anti-LKM1, peuvent être isolés dans 10 % des cas. Les titres des anticorps anti-LKM1 et anti-LC1 varient avec le stade de la maladie et le traitement utilisé. Lors de la phase aiguë, les autoanticorps sont absents ou de titre faible; à la phase chronique, le titre est élevé et devient très élevé lors de la phase cirrhotique de la maladie. La présence d'anticorps anti-LC1 semble être associée aux formes histologiques sévères.

Les anticorps anti-muscle lisse de spécificité F-actine font partie des critères diagnostiques des HAI-1, mais ils n'ont pas de valeur pronostique ni d'intérêt pour le suivi de la maladie. Le type d'anticorps anti-muscle lisse doit toujours être précisé, les anticorps anti-muscle lisse « non actine » n'étant pas spécifiques de l'HAI. Les anticorps anti-F-actine peuvent être présents dans d'autres maladies hépatiques (hépatites virales C, B, A, ou médicamenteuses, cirrhose alcoolique, CBP, cancer) et dans des pathologies auto-immunes non hépatiques (connectivites, maladie coeliaque, thyroïdites, diabète, maladie de Biermer).

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Examen de première intention dans la recherche d'une hépatopathie auto-immune (CBP, HAI). Il

doit être interprété en fonction du contexte clinique, des données biologiques ou histologiques, de la connaissance des sérologies virales et des prises médicamenteuses.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Pas de contrainte d'acheminement : transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Immunofluorescence indirecte (IFI) sur triple substrat (foie/rein/estomac de rat, coupes de tissus commerciales ou maison) indispensable en première intention. Elle a pour avantage de permettre la détection de l'ensemble des anticorps, à l'exception des anti-SLA et des anti-ASGPR (cf. <a href="#">Fiches 5.3 et 5.4</a> ). Pour les anticorps anti-muscle lisse de spécificité F-actine : IFI sur cellules HEP-2 traitées ou non à la colchicine, cellules VSM47, cellules épithéliales d'intestin de rat. L'identification précise des spécificités antigéniques est effectuée en seconde intention sur antigènes natifs ou recombinants en immunodot, ELISA, western blot (test maison), immunodiffusion double (test maison) ou immunofluorimétrie en flux sur billes (ALBIA). Les anticorps anti-LC1 peuvent être difficiles à mettre en évidence par IFI en cas d'association aux anti-LKM1. Ils doivent être recherchés par une autre technique dans ce cas.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable (IFI, immunodots, ELISA).
<b>Type de mesure</b>	Tests qualitatifs avec données quantifiables (titration).
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité clinique des AMA-2 pour la CBP varie de 90 à 95 % selon les études, la spécificité de 95 à 98 %. Les anticorps anti-LKM1 sont présents dans plus de 85 % des HAI-2 ; ils peuvent être également présents au cours des hépatites virales C (0 à 7 %). La fréquence des anticorps anti-LC1 dans l'HAI-2 varie de 30 à 50 % ; on peut en observer dans des porphyries cutanées tardives. Les sensibilité et spécificité cliniques des anticorps anti-F-actine pour l'HAI-1 sont respectivement de 85 % et 80 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité.

## Fiche 5.3

**Anticorps anti-Soluble Liver Antigen (SLA)****Signification biologique du paramètre**

Les autoanticorps anti-SLA sont des marqueurs diagnostiques de l'hépatite auto-immune de type 1 (HAI-1). Ils sont intégrés comme critère additionnel dans la grille de score diagnostique des HAI depuis 1999 puis dans les critères simplifiés de 2008. L'antigène SLA est une o-phosphoséryl-ARNt(sec)-sélénium transférase (tRNP(sec)).

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Les anticorps anti-SLA sont rapportés chez 15 à 35 % des malades souffrant de HAI-1 (de 6 à 58 % selon les études). Ces anticorps ont également été décrits dans 15 à 30 % des formes mixtes HAI/CBP. Leur principal intérêt est d'aider au diagnostic des hépatites séronégatives qu'ils permettent de reclasser en HAI-1 (prévalence de 15 à 20 %

dans les hépatites cryptogéniques). Ils ont été décrits dans de très rares cas d'hépatite virale C et d'hépatites médicamenteuses. Ces anticorps pourraient également permettre de mieux évaluer le risque de rechute à l'arrêt du traitement de l'HAI (plus important si l'anticorps est présent) et, pour les patients transplantés, le risque de récurrence.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

La pertinence des anticorps anti-SLA dans le diagnostic des HAI-1 est aujourd'hui démontrée. Ils peuvent être recherchés en première intention en cas de forte suspicion d'HAI ou en seconde intention après détection des marqueurs conventionnels par immunofluorescence indirecte (IFI, cf. [Fiche 5.2](#)). Leur recherche est indispensable devant une forte suspicion d'HAI et une absence d'anticorps conventionnels par IFI.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Ces anticorps ne sont pas détectables par IFI sur triple substrat (foie/rein/estomac de rat). L'identification précise des spécificités antigéniques est effectuée sur antigènes natifs (fraction cytosolique de foie) ou recombinants (tRNP(sec) en immunodot (le plus souvent), ELISA classique ou par inhibition (maison), RIA.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité des anticorps anti-SLA varie de 15 à 35 % selon les études. Leur spécificité est excellente : 98 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité.

## Fiche 5.4

**Anticorps anti-récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR)****Signification biologique du paramètre**

Les ASGPR sont des marqueurs de l'hépatite auto-immune (HAI). Ils sont intégrés comme critère additionnel dans la grille de score diagnostique des HAI depuis 1999.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Les ASGPR sont détectés chez 50 à 80 % des malades présentant une HAI-1 ou une HAI-2, mais aussi dans diverses maladies hépatiques : hépatites virales (B ou C), alcooliques, cirrhose biliaire primitive (CBP), maladies auto-immunes non hépatiques.

Ce sont des marqueurs de sévérité de l'HAI. Il existe une corrélation entre la présence de ces anti-

corps et les signes d'activité histologique identifiés sur une biopsie hépatique, ainsi qu'avec les taux d'ASAT/ALAT et d'immunoglobulines G. Le taux des anticorps diminue chez les patients sous immunosuppresseur et, lorsqu'il reste élevé, le risque de rechute à l'arrêt de ce traitement est plus fréquent.

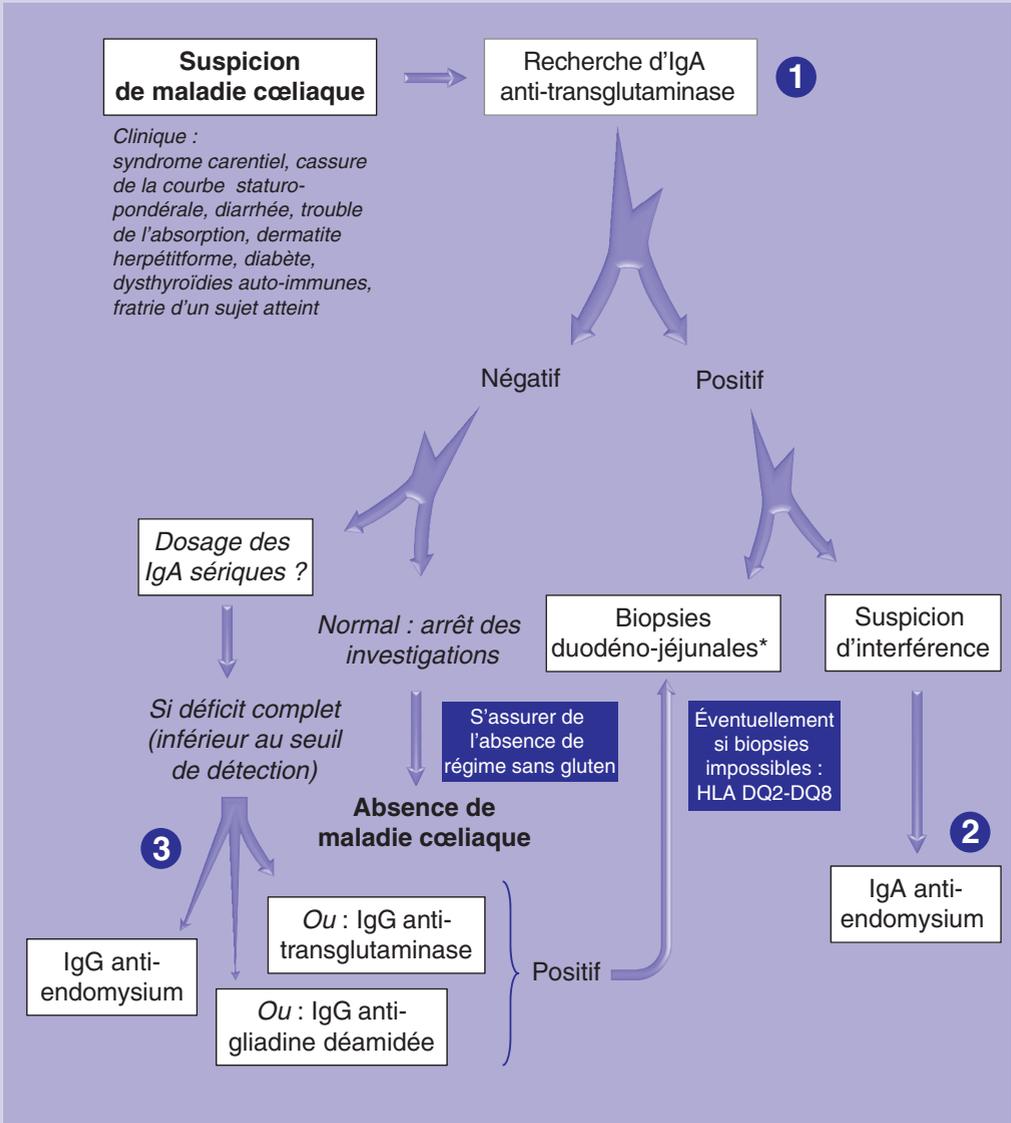
**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Dans le cadre du diagnostic biologique des HAI, la recherche d'anticorps anti-ASGPR est utile en seconde intention, lorsque les marqueurs classiques sont négatifs (antinucléaires, anti-actine, anti-SLA, anti-LKM et anti-LC1 : cf. [Fiches 5.1 à 5.3](#)). La recherche de ces anticorps est utile pour la surveillance de la maladie.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiqes ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation
<b>Principe méthodologique</b>	RIA ou ELISA maison ou commercial (antigène de l'ASGPR purifié à partir de foie).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité des ASGPR varie de 50 à 85 % selon les études, la nature de l'antigène et le stade de l'HAI : de 75 à 85 % en phase active, autour de 30 % en rémission. Ces anticorps peu spécifiques sont détectés dans environ 15 % des hépatites virales, 15 % des hépatites alcooliques et 0 à 25 % des CBP. Ils ne sont jamais détectés chez les sujets sains.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Ce test reste réservé aux centres spécialisés dans ce domaine d'exploration.

Synopsis VII

Prescription des anticorps associés à la maladie cœliaque



\* Selon Husby et al. 2012, la réalisation de l'endoscopie et des biopsies à visée de diagnostic histologique pourraient être remplacées par la réalisation d'un génotypage HLA, à la recherche des groupes à risque. Cette pratique n'est pas encore validée en France. Il faut noter que les examens de génotypage ne sont pas remboursés par la Sécurité sociale et que les frais liés à la prescription de cette analyse sont à la charge du patient.

## Fiche 5.5

### Anticorps anti-transglutaminase tissulaire (anti-tTG)

#### Signification biologique du paramètre

La transglutaminase tissulaire est un des autoantigènes majeurs, cible de la réactivité auto-immune associée à l'intolérance au gluten notamment au cours de la maladie cœliaque. C'est une enzyme présente, entre autres, dans les entérocytes. Elle assure la déamidation de la glutamine, en particulier dans la gliadine des céréales. La recherche d'IgA anti-tTG participe à l'étape diagnostique de la maladie, permettant classiquement de poser l'indication de l'endoscopie digestive et la réalisation de biopsies duodénales à la recherche des signes histologiques de maladie cœliaque. La mise en évidence d'IgA anti-tTG à titre élevé peut suffire pour poser le diagnostic chez l'enfant.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche et le titrage des IgA anti-tTG constituent la seule prescription à réaliser en première intention en vue du dépistage de la maladie cœliaque. Elle peut être utilement combinée au dosage pondéral des IgA sériques permettant d'objectiver un déficit en IgA ( $< 0,2$  g/L) qui rend le test négatif. Dans ce cas, une recherche des

IgG anti-endomysium ou un dosage des IgG anti-tTG ou encore des IgG anti-gliadine déamidée doit être proposée. Dans le cadre de l'évaluation de la compliance stricte au régime sans gluten, qui constitue le traitement de la maladie cœliaque, les IgA anti-tTG disparaissent après 12 à 18 mois. En cas de non-observance du régime, la concentration des IgA anti-tTG se majore ou ne diminue pas. Ces anticorps sont également détectés dans la dermatite herpétiforme, intolérance au gluten d'expression cutanée avec souvent une atteinte intestinale associée (parfois asymptomatique).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche en première intention des IgA anti-tTG constitue la démarche la plus rentable en termes de rapport bénéfice/coût du diagnostic biologique de la maladie cœliaque. Cette seule prescription suffit donc à la majorité des dépistages. Pour les laboratoires dont le recrutement est trop faible pour justifier une recherche par méthode ELISA, le sérodiagnostic de maladie cœliaque peut être fait par la recherche d'IgA anti-endomysium (cf. [Fiche 5.6](#)).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Pour l'isotype IgA : réfrigéré 2 semaines, congelé > 1 an. Pour l'isotype IgG : réfrigéré 4 semaines, congelé > 1 an.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA, FEIA, RIA, immunofluorimétrie en flux (ALBIA), immunodot.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée pour l'ELISA et l'immunodot. Automates dédiés pour le FEIA et l'immunofluorimétrie en flux.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative ou qualitative (immunodot).
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Le dosage des IgA anti-tTG présente des performances supérieures à celui des IgG anti-tTG. La sensibilité et la spécificité des dosages d'IgA anti-tTG sont supérieures à 95 %. Selon les recommandations de l'EPSGHAN, dans le cadre d'un diagnostic chez l'enfant et l'adolescent, un résultat d'IgA anti-tTG supérieur à 10 fois le seuil de positivité du coffret utilisé est très évocateur de maladie cœliaque.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les taux inférieurs à 2 ou 3 fois le seuil de positivité du coffret utilisé (en phase diagnostique et non en suivi) peuvent être le reflet d'interférences, en l'absence de régime excluant le gluten. Il peut alors être utile de réaliser une recherche d'IgA anti-endomysium. Les déficits en IgA sont à l'origine de résultats négatifs lors du dosage des IgA anti-tTG et anti-endomysium. Il convient alors de remplacer la recherche d'IgA anti-transglutaminase par la recherche d'IgG anti-endomysium ou anti-tTG ou anti-gliadine déamidée (il n'est pas utile d'associer deux ou trois paramètres). Des faux positifs sont rencontrés avec certains coffrets en présence de fortes concentrations d'IgA (myélome, hépatite...) Chez les enfants jusqu'à 2 ans, en cas de négativité des anti-tTG, l'intérêt du dosage des IgG anti-gliadine déamidée est discuté.

## Fiche 5.6

### Anticorps anti-endomysium et anti-réticuline

#### Signification biologique du paramètre

L'endomysium est une structure anatomique formée de tissu conjonctif lâche qui entoure chaque fibre musculaire lisse. Au niveau de certaines muqueuses digestives (*muscularis mucosae* de l'œsophage ou duodénum), cette structure est riche en transglutaminase tissulaire de type 2 (tTG-2). Elle peut donc être utilisée pour révéler les anticorps anti-endomysium par IFI en cas de suspicion de maladie cœliaque.

Des anticorps spécifiques de la maladie cœliaque peuvent également marquer d'autres fibres de type collagène localisées dans le foie et le rein, donnant un aspect « réticulé » sur les coupes hépatiques et rénales du triple substrat de rat (aspect spécifique « R1 » des anticorps anti-réticuline).

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

*Anticorps anti-endomysium* – Le diagnostic de maladie cœliaque repose sur la mise en évidence d'anticorps anti-transglutaminase, dont le principe technique est simple à mettre en œuvre (cf. Fiche 5.5). Pour les laboratoires dont le recrutement est trop faible pour justifier une recherche par méthode ELISA (ou autres), le sérodiagnostic de maladie cœliaque peut être fait par la recherche d'IgA anti-endomysium, à condition que ces laboratoires justifient d'une pratique régulière assurant leur expertise dans le domaine de lecture de l'IFI. La prescription simultanée d'IgA anti-tTG et d'IgA anti-endomysium est redondante. En revanche, un résultat douteux d'IgA anti-tTG

peut avoir à être contrôlé par une recherche d'IgA anti-endomysium. En cas de déficit en IgA (concentration < 0,2 g/L), une recherche d'IgG anti-endomysium (ou d'IgG anti-tTG ou d'IgG anti-gliadine déamidée) doit être proposée. Dans le cadre de l'évaluation de la compliance stricte au régime sans gluten, qui constitue le traitement de la maladie cœliaque, les IgA anti-endomysium disparaissent après 12 à 18 mois. En cas de non-observance du régime, le titre des IgA anti-endomysium se majore ou ne diminue pas.

*Anticorps anti-réticuline* – La recherche des anticorps anti-réticuline est beaucoup moins performante que celle des autres marqueurs associés à la maladie cœliaque. Objectiver des anticorps anti-réticuline n'a d'intérêt qu'en cas de découverte fortuite lors de la réalisation d'une IFI sur triple substrat de rat dans d'autres contextes cliniques. Un aspect évocateur amène alors à la réalisation des tests de confirmation.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le sérodiagnostic de la maladie cœliaque peut être fait en première intention par la recherche des IgA anti-endomysium pour les laboratoires qui ont l'expérience de lecture au microscope à fluorescence. Pour les laboratoires réalisant la recherche des anticorps anti-tTG, la recherche des IgA anti-endomysium s'inscrit en seconde intention, dans le cadre de la vérification des résultats des dosages des IgA anti-tTG positifs dans un contexte laissant suspecter des interférences.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Pour l'isotype IgA : réfrigéré 2 semaines, congelé > 1 an. Pour l'isotype IgG : réfrigéré 4 semaines, congelé > 1 an.
<b>Principe méthodologique</b>	IFI sur coupes d'œsophage de singe (tiers inférieur) utilisant des anti-globulines spécifiques. On notera que la recherche des IgG anti-endomysium utilise un conjugué anti-chaînes gamma adsorbé sur IgG de singe.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables. À noter que la dilution de dépistage est faible : 1/5.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Pour un personnel exercé, les performances diagnostiques de la recherche des IgA anti-endomysium sont optimales, proches de 100 % en termes de sensibilité comme de spécificité.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	IgA anti-endomysium : présence d'IgA anti-F-actine donnant un aspect de fluorescence inverse, source de mésinterprétation pour un œil non exercé, mais surtout pouvant masquer la présence d'IgA anti-endomysium de titre élevé donnant un phénomène de zone. IgG anti-endomysium : importance de l'anti-globuline utilisée qui doit être adsorbée sur des IgG de singe.

## Fiche 5.7

## Anticorps anti-gliadine déamidée (ou peptides immunogènes de gliadine)

### Signification biologique du paramètre

La gliadine est la fraction alcool-soluble du gluten, protéine partiellement résistante à la digestion. Elle est à l'origine d'un processus de sensibilisation immunitaire qui s'accompagne d'une inflammation de la muqueuse intestinale et se complique, chez les sujets génétiquement prédisposés, d'une maladie cœliaque caractérisée par une atrophie villositaire ayant comme conséquence des troubles de l'absorption et des carences multiples.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le diagnostic de maladie cœliaque repose sur la mise en évidence d'IgA anti-transglutaminase (tTG) dont le principe technique est simple à

mettre en œuvre (cf. Fiche 5.5). Ce n'est qu'en cas de déficit documenté en IgA (< 0,2 g/L) qu'une recherche des IgG anti-gliadine déamidée peut être proposée. *Les trousseaux dosant les anticorps anti-gliadine native doivent être abandonnés* du fait de leurs mauvaises performances (manque de spécificité). Seule la recherche des anticorps anti-gliadine déamidée présente un intérêt.

Le dosage des IgA anti-gliadine déamidée, moins sensible que le dosage des IgA anti-tTG, ne présente que peu d'intérêt.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche d'IgG anti-gliadine déamidée peut être utilisée en première intention en cas de déficit en IgA connu (ou chez l'enfant de moins de 2 ans).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Pour l'isotype IgA : réfrigéré 2 semaines, congelé > 1 an. Pour l'isotype IgG : réfrigéré 4 semaines, congelé > 1 an.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA, FEIA, RIA, immunofluorimétrie en flux (ALBIA), immunodot.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée pour l'ELISA et l'immunodot. Automates dédiés pour le FEIA et l'immunofluorimétrie en flux.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative ou qualitative (immunodot).
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Selon les données de la littérature, les performances seraient comparables à celles des IgA anti-tTG.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Ne pas utiliser de gliadine native, source d'altérations majeures des performances.

## Fiche 5.8

**Anticorps anti-cellules pariétales gastriques****Signification biologique du paramètre**

Les anticorps anti-cellules pariétales gastriques sont dirigés contre la pompe à protons, l'H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase qui assure la sécrétion de l'acide chlorhydrique dans l'estomac. Ils sont présents dans le sérum de patients souffrant de gastrites auto-immunes, gastrite A (gastrite atrophique du fundus) ou de maladie de Biermer (associant un déficit en vitamine B12). L'anémie de Biermer est également dénommée anémie pernicieuse.

L'antigène est constitué de deux sous-unités, alpha catalytique et bêta glycoprotéique ; les anticorps reconnaissent des épitopes présents sur la molécule native et les sous-unités.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche de ces anticorps est indiquée en cas de suspicion de gastrite auto-immune, de maladie de Biermer, de thyroïdite auto-immune, chez les diabétiques de type 1 et dans la fratrie de patients atteints de maladie de Biermer. Ils n'ont aucun intérêt pour le suivi de ces pathologies.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Il s'agit d'un examen de première intention dans la recherche d'une gastrite auto-immune. Il doit être associé à la recherche d'anticorps anti-facteur intrinsèque dans la maladie de Biermer (cf. [Fiche 5.9](#)).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	IFI sur coupes d'estomac de souris (l'estomac de rat peut donner de fausses réactivités liées à la présence d'anticorps hétérophiles) sur coupes maison ou commerciales (anticorps non spécifiques d'espèce). ELISA, immunodot ou immunofluorimétrie en flux sur billes (ALBIA) utilisant de l'H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase isolée et purifiée à partir de muqueuse gastrique de porc.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison ou commercial.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Test hautement spécifique et sensible (> 99 %) pour une gastrite auto-immune. Les anticorps sont trouvés dans 90 % des cas de maladies de Biermer, mais n'en sont pas spécifiques car ils sont trouvés aussi dans 30 % de la fratrie et chez les patients atteints de polyendocrinopathie auto-immune. Les titres d'anticorps ne sont pas corrélés avec la sévérité de la gastrite auto-immune.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Si des anticorps anti-cellules pariétales gastriques sont détectés en IFI, il est indispensable d'éliminer la présence d'anticorps anti-mitochondries de type 2 (donnant aussi un marquage des cellules pariétales et rendant impossible l'interprétation de l'IFI) (cf. <a href="#">Fiche 5.2</a> ).

## Fiche 5.9

**Anticorps anti-facteur intrinsèque (anti-FI)****Signification biologique du paramètre**

Le facteur intrinsèque (FI) est une glycoprotéine de 50 kDa sécrétée par les cellules pariétales gastriques, qui forme un complexe dans la lumière de l'estomac avec la vitamine B12 alimentaire, nécessaire à l'absorption de la vitamine au niveau de l'iléon. Deux types d'anticorps sont décrits, ceux se fixant sur le site de fixation de la vitamine B12 (type 1) et ceux se fixant en dehors de ce site (type 2). Ces anticorps interfèrent avec l'absorption de la vitamine B12 et sont un marqueur de la maladie de Biermer. L'anémie de Biermer est également dénommée anémie pernicieuse.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche de ces anticorps est indiquée pour le diagnostic de la maladie de Biermer, non seulement pour la morbidité associée à l'anémie mais aussi pour ses atteintes neurologiques irréversibles.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Cet examen est associé à la recherche d'anticorps anti-cellules pariétales gastriques (cf. Fiche 5.8) car, bien que spécifique (> 99 %), il est moins sensible (70 %) pour le diagnostic de la maladie de Biermer que ce dernier test.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Le premier test développé était un dosage radio-immunologique fondé sur l'inhibition, par le sérum testé, de la fixation sur du facteur intrinsèque de vitamine B12 marquée par un isotope purifié. Ce test est faussé par un traitement récent par de la vitamine B12 et ne reconnaît pas les anticorps de type 2. Il est remplacé par des techniques immunoenzymatiques de type ELISA, immunodot, immunofluorescence sur spot de FI ou d'immunofluorimétrie en flux sur billes utilisant du FI purifié d'origine animale (estomac de porc) ou, plus récemment, du FI humain recombinant.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative ou qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Les anticorps anti-FI sont détectés dans environ 60–70 % des cas de maladie de Biermer et sont spécifiques (> 99 %).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité.

## Fiche 5.10

**Anticorps anti-anhydrase carbonique II****Signification biologique du paramètre**

L'anhydrase carbonique II est une enzyme ubiquitaire catalysant l'hydratation du CO<sub>2</sub> pour former de l'acide carbonique. Elle est la cible d'autoanticorps impliqués dans les pancréatites auto-immunes.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La principale indication clinique de la recherche de ces autoanticorps est l'aide au diagnostic des pancréatites auto-immunes, qui représentent près de 2 % des pancréatites chroniques. Ces marqueurs sont une aide au diagnostic différentiel avec l'adénocarcinome pancréatique et avec la pancréatite chronique alcoolique. Les autoanti-

corps dirigés contre l'anhydrase carbonique II sont détectés dans 13 à 76 % des sérums de malades ayant une pancréatite auto-immune mais seulement chez 2 % des sujets sains. Les plus grandes fréquences sont rapportées dans les études japonaises.

Leur spécificité est faible. La présence de ces anticorps est également rapportée dans le syndrome de Sjögren et le diabète auto-immun.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Dans le cadre du diagnostic biologique des pancréatites auto-immunes, la recherche des anticorps anti-anhydrase carbonique II est couplée à celle des anticorps anti-lactoferrine et au dosage des IgG4.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes de transport</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Maison : ELISA ou western blot. L'ELISA utilise comme antigène de l'anhydrase carbonique II extraite d'érythrocytes humains (antigène commercial).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Peu spécifique : ces anticorps sont détectés dans environ 10 % des pancréatites alcooliques et jusqu'à 60 % des syndromes de Sjögren. Dans les pancréatites auto-immunes, la positivité des anticorps anti-anhydrase carbonique II est associée à une élévation du taux des IgG4. Dans le syndrome de Sjögren, la positivité des anticorps anti-anhydrase carbonique II est observée sans élévation du taux d'IgG4.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Ce test reste réservé aux centres spécialisés dans ce domaine d'exploration.

## Fiche 5.11

**Anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)****Signification biologique du paramètre**

Ces anticorps reconnaissent des phosphopeptido-mannanes de la paroi des levures. Ils sont associés à la maladie de Crohn. Ils sont recherchés sur des extraits de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche des ASCA d'isotype IgA et IgG est utile dans le diagnostic différentiel entre rectocolite hémorragique (RCH) et maladie de Crohn, notamment dans l'exploration de colites inclasées. Les ASCA seraient liés à un âge précoce de survenue de la maladie de Crohn, à une localisation iléale et à l'apparition de complications perforantes et sténosantes nécessitant un traitement chirurgical plus fréquent. Leur utilité dans le dépistage des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) est plus modérée, du fait de leur manque de spécificité. Ils peuvent être observés dans 30 à 50 % des maladies cœliaques mais

aussi dans la maladie de Behçet, la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive et la spondylarthrite ankylosante.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Pour le diagnostic différentiel entre RCH et maladie de Crohn, la recherche des ASCA doit être associée à celle d'anticorps dirigés contre un antigène nucléaire des polynucléaires neutrophiles fixés par l'éthanol (cf. Fiche 4.9). Ces P-ANCA atypiques (ou X-ANCA ou NANA, pour *Nuclear-Associated Neutrophil Antibodies*) ont un aspect de fluorescence particulier. Deux profils peuvent être définis : un profil ASCA<sup>+</sup>/NANA<sup>-</sup> associés à la maladie de Crohn et un profil ASCA<sup>-</sup>/NANA<sup>+</sup> associé à la RCH. Le titrage des anticorps n'est pas utile en pratique clinique car le titre n'est pas corrélé à l'activité de la maladie. La répétition de la recherche n'est donc pas justifiée. Ces anticorps ne sont pas prédictifs de la réponse au traitement.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes de transport</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les ASCA d'isotype IgA et IgG peuvent être recherchés soit par IFI sur frottis fixés de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , soit par des tests immunoenzymatiques de type ELISA dont les sources antigéniques sont variées : extraits de levures disloquées ou phosphopeptidomannanes purifiés.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec donnés quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison ou commercial.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité des ASCA pour le diagnostic de la maladie de Crohn varie de 30 à 80 %. Ces anticorps sont également présents dans 5 à 30 % des RCH et dans 0 à 5 % des sérums de témoins sains.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sans particularité.

## Fiche 5.12

**Calprotectine fécale****Signification biologique du paramètre**

La calprotectine est un hétérocomplexe de deux protéines MRP8 (S100A8) et MRP14 (S100A9) appartenant à la superfamille S100 des protéines liant le calcium et le zinc. Elle représente 60 % des protéines solubles dans la fraction cytosolique des polynucléaires neutrophiles. Elle est aussi présente dans les macrophages et monocytes en quantité plus faible. Elle présente des propriétés antibactériennes et antifongiques, immunomodulatrices et proapoptotiques.

Des niveaux élevés de calprotectine ont été retrouvés dans les fluides extracellulaires (selles, plasma) au cours de processus inflammatoires variés. Son taux est directement proportionnel à la migration des PNN dans la lumière intestinale et reflète l'état inflammatoire de la muqueuse digestive.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage de la calprotectine dans les selles permet la différenciation des maladies intestinales organiques inflammatoires (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) des troubles fonctionnels intestinaux.

Son dosage dans les MICI permet une évaluation de l'activité mais aussi de la rémission puisque sa disparition permet de juger de la cicatrisation muqueuse. Elle est également proposée en suivi de l'efficacité des traitements.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Marqueur puissant d'inflammation intestinale, elle présente une alternative aux tests invasifs notamment aux endoscopies (intérêt en pédiatrie).

<b>Nature du prélèvement</b>	Échantillon de selles. Prélèvement : 1 à 2 g.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Selles du matin si possible.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement rapide au laboratoire puis conservation à + 4 °C jusqu'à 6 jours.
<b>Mode de conservation</b>	Si l'analyse doit être différée, il est souhaitable de congeler la selle à - 20 °C. Éviter les cycles de décongélation qui peuvent entraîner une augmentation des valeurs de calprotectine en raison de la présence de polynucléaires dans les selles. L'extraction de la calprotectine fécale se fait dans un tampon adéquat. Les extraits sont stables 4 mois congelés.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA, FEIA, immunochromatographie.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative : immunochromatographie. Quantitative : ELISA, FEIA.
<b>CIQ</b>	Maison (pool d'extraits).
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La valeur prédictive positive est estimée à 91 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Valeurs élevées retrouvées dans les entérites bactériennes, parasitaires, maladie cœliaque, certains cancers ou lors de la prise d'anti-inflammatoire non stéroïdien. À l'inverse, existence de faux négatifs chez les sujets neutropéniques. De même du fait de l'immaturation et de la perméabilité intestinale chez les enfants, les valeurs seuils de calprotectine ne sont pas superposables à celles de l'adulte.

## Bibliographie du chapitre 5

FICHE 5.1 – Anticorps antinucléaires associés aux hépatopathies auto-immunes

Duarte-Rey C, et al. Primary cirrhosis and the nuclear pore complex. *Autoimmun Rev* 2012; 11 : 898–902.

Johanet C, et al. Autoantibodies in auto-immune hepatitis : antinuclear antibodies (ANA). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36 : 394–6.

Muratori P, et al. The serological profile of the auto-immune hepatitis/primary biliary cirrhosis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009; 104 : 1420–5.

Nakamura M, et al. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007; 45 : 118–27.

Poupon R, et al. Primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 52 : 745–58.

Wichmann I, et al. Clinical significance of anti-multiple nuclear dots/Sp1000 autoantibodies. *Scand J Gastroenterol* 2003; 9 : 996–9.

FICHE 5.2 – Anticorps anti-mitochondries, anti-LKM1, anti-cytosol, anti-muscle lisse et anti-F-actine  
Maladies auto-immunes du foie. Cahier de formation biologie médicale n°37. Bioforma; 2006.

Hennes EM, et al. Simplified criteria for the diagnosis of auto-immune hepatitis. *Hepatology* 2008; 48 : 169–76.

Johanet C, et al. Autoanticorps et pathologies hépatiques. *RFL* 2006; 387 : 25–31.

Johanet C, et al. Autoanticorps en hépatologie. (Elsevier, Paris); 2010 7-007-B-30. Hépatologie. *Encycl Méd Chir*.

Johanet C, et al. Autoantibodies in auto-immune hepatitis : anti-smooth muscle antibodies (ASMA). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36 : 189–91.

FICHE 5.3 – Anticorps anti-*Soluble Liver Antigen* (SLA)

Alvarez F, et al. International auto-immune hepatitis group report : review of criteria for diagnosis of auto-immune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31 : 929–38.

Hennes EM, et al. Simplified criteria for the diagnosis of auto-immune hepatitis. *Hepatology* 2008; 48 : 169–76.

Johanet C, et al. Anticorps anti-antigènes solubles du foie (anti-SLA) et hépatites auto-immunes. *Immunol Biol Spec* 2011; 26 : 118–24.

Johanet C, et al. Autoantibodies in auto-immune hepatitis : anti-soluble liver antigen (SLA). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36 : 244–6.

FICHE 5.4 – Anticorps anti-récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR)

Alvarez F, et al. International auto-immune hepatitis group report : review of criteria for diagnosis of auto-immune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31 : 929–38.

Chantran Y, et al. Autoantibodies in auto-immune hepatitis : anti-asialoglycoprotein receptor (anti-ASGPR) antibodies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36 : 510–2.

FICHE 5.5 – Anticorps anti-transglutaminase tissulaire (anti-tTG)

Husby S, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54 : 136–60.

Olen O, et al. Antibodies against deamidated gliadin peptides and tissue transglutaminase for diagnosis of pediatric celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55 : 695–700.

FICHE 5.6 – Anticorps anti-endomysium et anti-réticuline

Husby S, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54 : 136–60.

FICHE 5.7 – Anticorps anti-gliadine déamidée (ou peptides immunogènes de gliadine)

Husby S, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 54 : 136–60.

Monzani A, et al. Use of deamidated gliadin peptide antibodies to monitor diet compliance in childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 53 : 55–60.

Mozo L, et al. Diagnostic value of anti-deamidated gliadin peptide IgG antibodies for celiac disease in children and IgA-deficient patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55 : 50–5.

FICHE 5.8 – Anticorps anti-cellules pariétales gastriques

Toh BH, et al. Parietal cell and intrinsic factor autoantibodies. In : Shoenfeld Y, editor. *Autoantibodies*. Elsevier; 2007. p. 479–86.

Toh BH, et al. Autoimmune gastritis. In : Shoenfeld Y, editor. *Diagnostic criteria in auto-immune diseases*. Elsevier; 2008. p. 315–21.

Toh BH, et al. Cutting edge issues in autoimmune gastritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 42 : 269–78.

FICHE 5.9 – Anticorps anti-facteur intrinsèque (Anti-FI)

Toh BH, et al. Parietal cell and intrinsic factor autoantibodies. In : Shoenfeld Y, editor. *Autoantibodies*. Elsevier; 2007. p. 479–86.

Toh BH, et al. Autoimmune gastritis. In : Shoenfeld Y, editor. *Diagnostic criteria in auto-immune diseases*. Elsevier; 2008. p. 315–21.

Toh BH, et al. Cutting edge issues in autoimmune gastritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 42 : 269–78.

FICHE 5.10 – Anticorps anti-anhydrase carbonique II  
Aparisi L, et al. Antibodies to carbonic anhydrase and IgG4 levels in idiopathic chronic pancreatitis : relevance for diagnosis of auto-immune pancreatitis. *Gut* 2005; 54 : 703–9.

FICHE 5.11 – Anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)

Dubinsky MC, et al. Immunogenetic phenotypes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12 : 3645–50.

Iskandar HN, et al. Biomarkers in inflammatory bowel disease : current practices and recent advances. *Transl Res* 2012; 159 : 313–25.

Quinton J-F, et al. Anti- *Saccharomyces cerevisiae* Mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease : prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998; 42 : 788–91.

FICHE 5.12 – Calprotectine fécale

Sutherland AD, et al. Review of fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum* 2008; 51 : 1283–91.

Ezri J, et al. La calprotectine fécale en pédiatrie : utilisation et interprétation. *Rev Med Suisse* 2011; 7 : 69–70.

Roche C, et al. Intérêt de la calprotectine dans le diagnostic et le suivi des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Feuil Biol* 2013; 312 : 5–9.

Gisbert J-P, et al. Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2009; 41 : 56–66.

# Chapitre 6

## **Exploration des maladies endocriniennes auto-immunes**

## Fiche 6.1

### Anticorps anti-îlots de Langerhans

#### Signification biologique du paramètre

Le diabète auto-immun (ou diabète de type 1) est associé à la présence d'autoanticorps spécifiques d'antigènes exprimés par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La détection et le dosage des autoanticorps associés au diabète sont réalisés dans un but diagnostique, permettant de confirmer l'origine auto-immune d'un diabète insulino-dépendant ou de différencier des formes atypiques de diabète de type 1, comme le LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adult*), d'autres formes non auto-immunes de diabète (type 2).

La recherche de ces anticorps peut également être faite dans un but prédictif, permettant d'évaluer le risque de diabète auto-immun chez des individus à risque de développer la maladie (apparentés de sujets diabétiques de type 1).

Les anticorps associés au diabète de type 1 sont les anticorps anti-îlots de Langerhans (ICA, *Islet-Cell Antibodies*), anti-GAD (glutamate acide décar-

boxylase isoforme 65 kDa, exprimée également dans le système nerveux), anti-IA2 (portion intracellulaire d'une protéine tyrosine phosphatase-like, PTPRN), anti-insuline et anti-ZnT8 (*Zinc Transporter 8* exprimé uniquement dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche de ces autoanticorps est une démarche de première intention.

La recherche globale des anticorps anti-îlots de Langerhans par IFI a été supplantée par celle des anticorps spécifiques d'autoantigènes (IA2, GAD, principalement, anti-insuline et ZnT8 dont l'intérêt est en cours d'évaluation). Néanmoins, il existe de rares cas de patients souffrant d'un diabète de type 1 associé à la présence d'ICA sans les autres spécificités, ce qui suggère l'existence d'autres autoantigènes cibles non identifiés. Les ICA sont encore demandés par les cliniciens mais leur prescription mériterait d'être remplacée par la recherche précise des anti-IA2 et GAD, en première intention (cf. [Fiche 6.2](#)).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	IFI sur coupe de pancréas de primate supérieur. La disponibilité du substrat limite la diffusion de ce test qui est désormais remplacé par l'identification des spécificités anti-IA2 et anti-GAD.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Sensibilité au diagnostic 85 % (variable selon l'âge), spécificité > 95 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Le test est difficilement standardisable notamment du fait de l'utilisation de pancréas humain. La technique serait moins sensible avec les pancréas de primate (évaluation en cours). Ce test est quasi abandonné au profit des dosages utilisant des autoantigènes moléculairement définis. Il garde toutefois un intérêt diagnostique dans les cas de diabète de type 1 où les autres anticorps sont négatifs.

## Fiche 6.2

### Anticorps anti-IA2, anti-GAD, anti-ZnT8, anti-insuline

#### Signification biologique du paramètre

Le diabète auto-immun (ou diabète de type 1) est associé à la présence d'autoanticorps spécifiques d'antigènes exprimés par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La détection et le dosage des autoanticorps associés au diabète sont réalisés dans un but diagnostique, permettant de confirmer l'origine auto-immune d'un diabète insulino-dépendant ou de différencier des formes atypiques de diabète de type 1, comme le LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adult*), d'autres formes non auto-immunes de diabète (type 2). La recherche de ces anticorps peut également être faite dans un but prédictif, permettant d'évaluer le risque de diabète auto-immun chez des individus à risque de développer la maladie (apparentés de sujets diabétiques de type 1).

Les anticorps associés au diabète de type 1 sont les anticorps anti-îlots de Langerhans (cf. Fiche 6.1), anti-GAD (glutamate acide décarboxylase isoforme 65 kDa, exprimée également dans le système nerveux), anti-IA2 (portion intracellulaire d'une protéine tyrosine phosphatase-like, PTPRN), anti-insuline et anti-ZnT8 (*Zinc Transporter 8*

exprimé uniquement dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

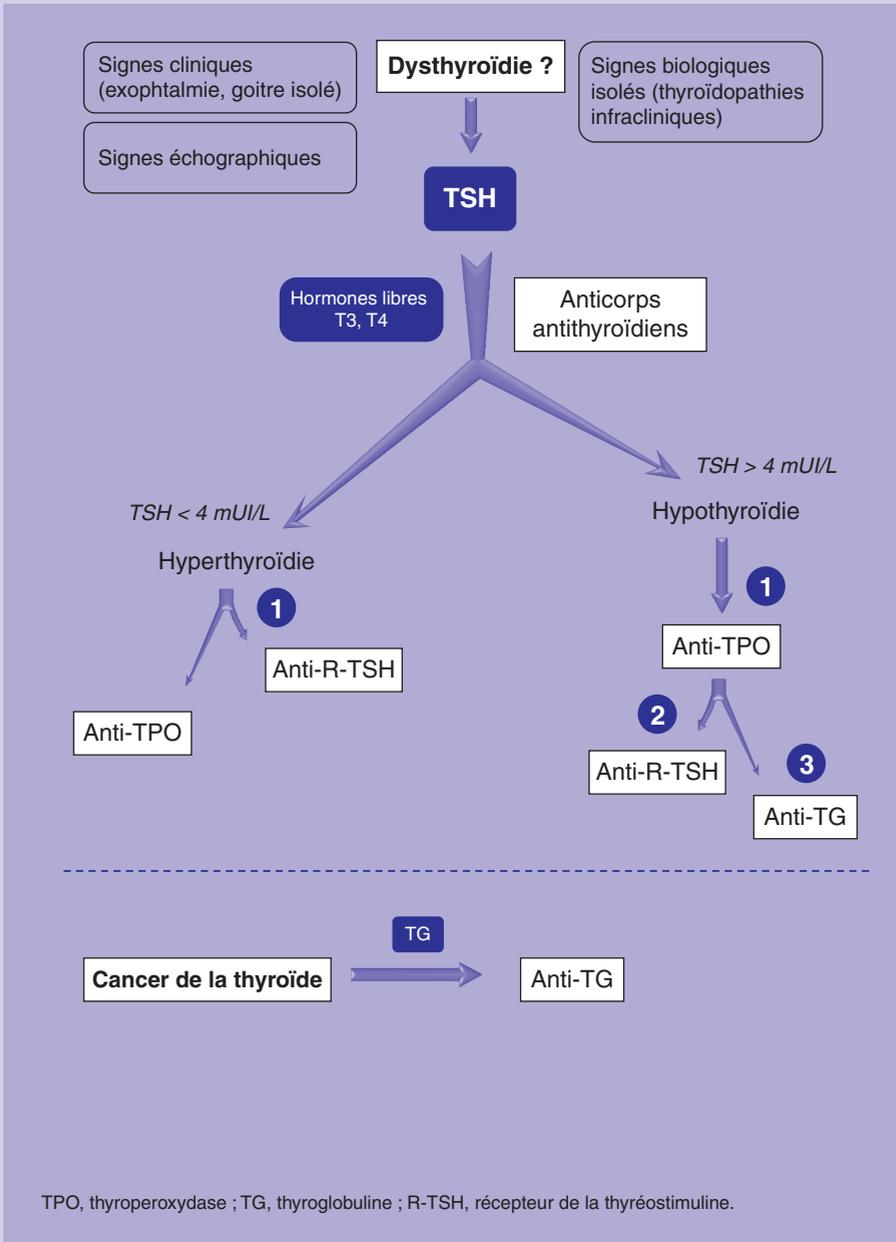
La recherche des anticorps anti-îlots de Langerhans par IFI a été supplantée par celle des anticorps spécifiques d'autoantigènes (IA2, GAD). Néanmoins, il existe des cas rares de patients porteurs d'un diabète de type 1 authentique avec des ICA mais sans anti-IA2, anti-GAD, anti-insuline et anti-ZnT8, ce qui suggère l'existence d'autres autoantigènes cibles non identifiés.

Le bilan étiologique de première intention comporte au minimum la recherche des anti-IA2 et anti-GAD en remplacement des ICA. La recherche d'anticorps anti-insuline doit faire appel aux méthodes ultrasensibles, ce qui l'inscrit en seconde intention. La recherche d'anticorps anti-insuline ne doit pas être réalisée chez un patient déjà traité par insuline. Les anticorps anti-ZnT8, récemment identifiés, sont en passe de faire partie de ce bilan systématique, compte tenu de leur intérêt diagnostique. Au moins un anticorps (anti-ICA, anti-GAD, anti-IA2, anti-insuline, anti-ZnT8) est présent au diagnostic dans > 90 % des cas.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les tests radio-immunologiques RIA, ou les tests maison de type <i>radioligand assays</i> (RLA) sont d'une grande sensibilité et considérés comme des méthodes de référence. Les tests ELISA ont des performances comparables en termes de sensibilité/spécificité en ce qui concerne les anti-GAD, les anti-IA2, et désormais les anti-ZnT8. Les performances sont encore en cours d'évaluation pour les anticorps anti-insuline dont la recherche est réservée aux centres spécialisés. La technique de référence est une méthode compétitive. Les autres techniques (RIA non compétitif, ELISA) sont de plus faible sensibilité.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité à la phase diagnostique est variable selon l'âge et selon les anticorps. Elle est de 80 % pour les anti-GAD65 dans le LADA, de 50 % pour les anti-IA2 (plus importante chez le sujet jeune) et pour les anti-insuline (plus importante chez les enfants), de 60 à 70 % pour les anti-ZnT8. La spécificité est supérieure à 95 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	On peut détecter des anticorps anti-GAD dans 60 % des cas de <i>Stiff Man syndrome</i> , rigidité musculaire associée à la présence d'anticorps dirigés contre l'isoforme 67 kDa de la GAD réagissant également avec l'isoforme de 65 kDa.

Synopsis VIII

Prescription des autoanticorps associés aux pathologies thyroïdiennes



## Fiche 6.3

### **Anticorps anti-thyroperoxydase (anti-TPO, anti-microsomes thyroïdiens)**

#### **Signification biologique du paramètre**

Les anticorps anti-microsomes thyroïdiens reconnaissent majoritairement la thyroperoxydase (TPO), enzyme clé de la synthèse des hormones thyroïdiennes. La TPO se localise au pôle apical du thyrocyte et intervient dans l'organification des iodures ainsi que dans le couplage des résidus iodotyrosyle au sein de la thyroglobuline.

Les anticorps anti-TPO apparaissent très tôt au cours du processus auto-immun, parfois avant les signes cliniques des thyroïdites d'Hashimoto, atrophique et du *post-partum*.

La prévalence des anticorps anti-TPO est de l'ordre de 10 % dans la population générale française.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage des anticorps anti-TPO vise à préciser l'origine auto-immune de troubles thyroïdiens cli-

niques ou échographiques. La recherche de ces anticorps peut être proposée avant mise sous traitement de patients euthyroïdiens par amiodarone, lithium, interféron alpha, GM-CSF ou IL-2. Leur titre est corrélé à l'infiltrat lymphoplasmocytaire de la thyroïde.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ces anticorps représentent le marqueur biologique le plus précoce des thyroïdites auto-immunes. Ils apparaissent plus rapidement et à des taux plus importants que les anticorps anti-thyroglobuline. Ils sont donc à proposer en première intention à la phase diagnostique. Au vu de leur sensibilité, la prescription isolée des anticorps anti-TPO est justifiée. En revanche, ces marqueurs n'apportent aucune aide au suivi du patient sous traitement.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune. La dilution du sérum réalisée au cours de la technique minimise l'impact de sérums hyperlipémiques ou fortement hémolysés qui peuvent être utilisés.
<b>Contraintes de transport</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	IFI, qui met en évidence un marquage apical des thyrocytes mais n'est pas strictement spécifique des anti-TPO. Hémagglutination indirecte, qui manque de sensibilité. RIA ou ELISA, par méthodes sandwich ou compétitives qui ont la même sensibilité et utilisent de la TPO purifiée ou recombinante.
<b>Type de méthode</b>	Automatisées ou automatisables.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative (étalonnage international <i>Medical Research Council 66/387</i> ).
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Les anticorps anti-TPO sont présents dans 90 à 100 % des thyroïdites cliniques (maladie d'Hashimoto) et 50 à 60 % des thyroïdites infra-cliniques. Les anticorps anti-TPO sont également élevés chez environ 85 % des patients présentant une maladie de Basedow non traitée. Parmi les patients présentant des anticorps anti-TPO, 50 à 75 % présentent une euthyroïdie, 5 à 50 % une hypothyroïdie infraclinique et 5 à 10 % une hypothyroïdie franche.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les méthodes d'hémagglutination ou d'immunofluorescence manquent de sensibilité. Le degré de pureté de la TPO conditionne les performances analytiques. Il faut privilégier les méthodes utilisant la TPO hautement purifiée native ou recombinante. La qualité de l'antigène garantit sa reconnaissance par toutes les classes et sous-classes d'anticorps. Malgré les problèmes de standardisation inhérents aux variations de seuil, les troussees restent corrélées en termes de positivité/négativité.

## Fiche 6.4

**Anticorps anti-thyroglobuline (anti-TG)****Signification biologique du paramètre**

Les anticorps anti-TG reconnaissent la protéine synthétisée par les thyrocytes et sécrétée dans la cavité folliculaire. La thyroglobuline constitue le composant principal de la substance colloïde thyroïdienne. Les anticorps produits au cours des thyroïdites auto-immunes reconnaissent la région II de la molécule. Au cours des cancers différenciés de la thyroïde, des anticorps sont également produits vis-à-vis de la TG (région IV, mais aussi II, III et V). Dans le contexte cancéreux, la présence des anticorps interfère avec le dosage de la thyroglobuline et peut conduire à sous-estimer la reprise d'un processus tumoral.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La première indication de la recherche d'anticorps anti-TG s'inscrit en combinaison du dosage de la

TG dans la prise en charge d'un cancer différencié de la thyroïde. Dans ce cadre, la présence d'anticorps anti-TG constitue alors également un marqueur tumoral.

En raison des performances des trousseaux recherchant les anticorps anti-TPO, la recherche des anti-TG est superflue en première ligne dans le diagnostic des thyroïdites auto-immunes.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Dans un contexte d'auto-immunité, le dosage des anticorps anti-TG devrait s'inscrire en seconde intention, après la recherche des anticorps anti-TPO (cf. Fiche 6.3), qui serait négative alors que le contexte évoque un processus auto-immun (histoire familiale, pathologies auto-immunes associées), c'est-à-dire dans moins de 5 % des cas.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes de transport</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation
<b>Principe méthodologique</b>	Hémagglutination indirecte, qui manque de sensibilité. RIA ou ELISA, par méthodes sandwich ou compétitives.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée ou automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative (étalonnage international <i>Medical Research Council 65/93</i> ).
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Les performances des différentes trousseaux sont globalement bonnes mais elles ne sont pas équivalentes. Les tests permettant de détecter les anticorps de différentes affinités doivent être utilisés dans le suivi du cancer différencié de la thyroïde.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	L'hémagglutination passive manque de sensibilité et doit être abandonnée au profit de méthodes d'immunoanalyse par compétition ou immunométriques utilisant des traceurs isotopiques, enzymatiques, fluorescents ou luminescents qui présentent des sensibilités équivalentes. Il est conseillé de réaliser le suivi des titres des anticorps anti-TG dans le même laboratoire, principalement dans le cadre du suivi de cancers.

## Fiche 6.5

### **Anticorps anti-récepteur de la *Thyroid Stimulating Hormone* (thyroestimuline) (anti-R-TSH)**

#### Signification biologique du paramètre

Les anticorps anti-R-TSH ont été découverts en 1956 par Adams et Purves. Il s'agit d'anticorps d'isotype essentiellement IgG1, dirigés contre le récepteur de la TSH situé sur le pôle basal du thyrocyte. En se liant à des épitopes du domaine extracellulaire du R-TSH, ces anticorps activent le système adénylcyclase membranaire conduisant à la production d'AMPc; conjointement, ils stimulent l'activité de la phospholipase A2.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les anticorps anti-R-TSH constituent les marqueurs sériques de la maladie de Basedow. Leur prescription s'inscrit pour préciser l'étiologie d'une hyperthyroïdie alors que les signes cliniques restent peu évocateurs d'une maladie de Basedow. Le titre des anticorps anti-R-TSH est corrélé à l'activité et la sévérité de l'ophtalmopathie. Les taux très élevés d'anticorps anti-R-TSH objectivés en fin de traitement sont prédictifs d'une rechute très rapide suivant l'arrêt de la thérapeutique. Le dosage des anticorps anti-R-TSH est important pour prédire les dysthyroïdies fœtales et/ou

néonatales dues au passage transplacentaire des anticorps chez toute femme enceinte ayant (ou ayant eu) une maladie de Basedow. Il est donc indiqué de rechercher ces anticorps pendant la grossesse en cas de maladie de Basedow en début de grossesse ou chez toute patiente recevant des antithyroïdiens de synthèse, patiente en rémission de cette pathologie ayant été traitée médicalement par antithyroïdiens de synthèse, patiente ayant subi une thyroïdectomie ou une IRAtérapie au préalable et chez laquelle peuvent persister des taux élevés d'anticorps-anti-R-TSH (surtout après traitement par iode radioactif), antécédent de grossesse avec hyperthyroïdie fœtale.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche des anticorps anti R-TSH s'effectue en première intention pour confirmer une maladie de Basedow (signes cliniques peu évocateurs) ou apprécier le risque d'évolution à l'arrêt du traitement.

Pendant la grossesse, les anticorps sont à rechercher au premier trimestre et à la 36<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes de transport</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation, décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	En routine, les anticorps anti-R-TSH sont dosés par des méthodes reposant sur l'inhibition de la liaison de la TSH à son récepteur et devraient être appelés « anticorps inhibant la liaison de la TSH ». Ce sont les TBIAb ( <i>Thyroid Binding Inhibition Antibodies</i> ). La terminologie TRAK ( <i>TSH-Rezeptor-Autoantikörper</i> ) a été adoptée par analogie à la dénomination des premières trousses de dosage commercialisées dans les années 1980. Dans les années 2000, des trousses dites de seconde génération utilisant le R-TSH humain fixé sur les parois des tubes et de la TSH bovine radiomarquée comme traceur sont commercialisées sous le nom de « TRAK humain ». Parallèlement, des dosages par chimioluminescence avec du R-TSH humain et de la TSH biotinylée se sont développés et sont majoritairement utilisés. Ces dernières années, l'utilisation d'un anticorps monoclonal (M22) dirigé contre la poche du R-TSH a généré des méthodes dites de troisième génération. Les méthodes permettant de distinguer les anticorps stimulants (TSAb pour <i>Thyroid Stimulating Antibody</i> ) des anticorps bloquants la TSH (TSBAb pour <i>Thyroid Stimulation Blocking Antibody</i> ) reposent sur leur effet biologique vis-à-vis de cellules thyroïdiennes en culture ou transfectées par le gène du R-TSH.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée et automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Les anticorps anti-R-TSH sont observés chez plus de 95 % des patients présentant une maladie de Basedow. Moins de 5 % des patients souffrant d'une authentique thyroïdite de Basedow, ne présenteraient pas d'anticorps anti-R-TSH, alors que la sérologie anti-TPO serait positive.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Ce test reste réservé aux centres spécialisés dans ce domaine d'exploration.

## Fiche 6.6

### Anticorps anti-surrénales

#### Signification biologique du paramètre

Les anticorps anti-corticosurrénales sont dirigés contre les trois différentes zones du cortex surrénalien : glomérulée, fasciculée et réticulée. Ils reconnaissent différentes enzymes des voies de la biosynthèse stéroïdienne.

Les différentes cibles sont la 21-hydroxylase (P450c21), présente dans les trois zones, qui constitue l'antigène majeur reconnu par les anticorps des patients atteints de maladie d'Addison auto-immune, la 17 $\alpha$ -hydroxylase (P450c17) présente dans les zones fasciculée et réticulée, et la 20,22-desmolase (P450scc) exprimée dans les trois zones. P450c17 et P450scc sont également présentes dans les thèques ovariennes et les cellules de Leydig testiculaires.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Ces anticorps sont des marqueurs diagnostiques et prédictifs de la maladie d'Addison auto-immune et des polyendocrinopathies auto-immunes (PEA). Les anticorps anti-corticosurrénales, dont les anticorps anti-21-hydroxylase, sont présents dans la maladie d'Addison isolée ou faisant partie d'une PEA.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

En cas de suspicion de maladie d'Addison auto-immune, la recherche d'autoanticorps anti-surrénales se fait en première intention. La recherche d'anti-21-hydroxylase peut y être associée ou demandée isolément.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les anticorps sont détectés par la technique d'IFI sur coupes congelées de surrenale de primate : le marquage des trois zones est en faveur d'anticorps anti-21-hydroxylase. Seuls les anticorps anti-21-hydroxylase peuvent être identifiés par une technique commerciale de type radio-immunologique.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles ou automatisables pour l'IFI, manuelle pour le RIA.
<b>Type de mesure</b>	IFI : qualitative à données quantifiables. RIA : du fait de l'absence d'étalons internationaux les résultats quantitatifs sont exprimés en unités arbitraires.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Les anticorps anti-corticosurrénales et les anticorps anti-21-hydroxylase sont détectés respectivement dans 80 % et dans 64 à 91 % des cas de maladie d'Addison idiopathique isolée. Ils sont présents dans 85 à 93 % des PEA de type 1 avec ou sans maladie d'Addison et 85 à 96 % des PEA de type 2. Les anticorps anti-17 alpha hydroxylase et anti-20,22-desmolase sont présents dans 5 à 9 % des maladies d'Addison isolées, 45 % des PEA de type 1 et 36 % des PEA de type 2. Moins de 2 % des sujets normaux et moins de 10 % des sujets souffrant de maladie auto-immune sans atteinte surrenale (thyroïdites auto-immunes, hypoparathyroïdies chroniques idiopathiques, gastrites atrophiques) ou souffrant d'une maladie d'Addison d'origine tuberculeuse ou d'une adrénoleucodystrophie présentent des anticorps anti-corticosurrénales.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les tests RIA peuvent générer des faux positifs pour les anti-21-hydroxylase dans moins de 10 % des cas.

## Fiche 6.7

**Anticorps anti-cellules productrices de stéroïdes****Signification biologique du paramètre**

Dans les polyendocrinopathies auto-immunes (PEA) peuvent être objectivés des anticorps anti- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase et des anticorps anti-P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase) spécifiques des cellules stéroïdes. On peut également observer des anticorps anti-P450Sc (20,22-desmolase) et anti-P450c21 (21-hydroxylase).

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche des anticorps anti-cellules stéroïdes peut constituer une aide au diagnostic des PEA de types 1 et 2, et des insuffisances gonadiques auto-immunes (insuffisance ovarienne précoce, hypogonadisme masculin).

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Il s'agit d'un examen sérologique de première intention.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Détectés par IFI sur coupes congelées de surrénales, ovaire et testicule de primate, les autoanticorps anti-cellules stéroïdes marquent principalement les cellules des couches fasciculée et réticulée de la corticosurrénale, ainsi que les cellules de Leydig du testicule, de la thèque interne de l'ovaire et du trophoblaste du placenta.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisable (automate préparateur de lames).
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Dans le cadre des PEA de type 1, on retrouve des anticorps anti-P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase) chez 55 % des patients et des anticorps anti-P450Sc (20,22-desmolase) chez 45 %. Dans les PEA de type 2, 30 % des patients ont des anticorps anti-P450c17 et 40 % des anti-P450Sc. En cas de ménopause précoce primitive, les anticorps anti-cellules stéroïdes coexistent avec les anticorps anti-corticosurrénales chez 22 % des sujets. Les anticorps anti-cellules stéroïdes sont détectés de façon isolée dans certains cas de ménopause précoce et d'hypogonadisme masculin.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les anticorps de groupe sanguin AB peuvent donner un faux marquage des cellules endothéliales des vaisseaux des testicules et des ovaires qui peut être confondu avec celui des cellules de Leydig et de la thèque de l'ovaire.

## Fiche 6.8

### Anticorps anti-récepteur sensible au calcium

#### Signification biologique du paramètre

Ces anticorps sont dirigés contre le récepteur sensible au calcium (CaSR) fortement exprimé par les cellules principales des parathyroïdes. Cet antigène est la cible majeure des autoanticorps antiparathyroïdiens détectés chez des patients atteints d'hypoparathyroïdie ou d'hyperparathyroïdie d'origine auto-immune.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les anticorps anti-CaSR sont des marqueurs diagnostiques de l'origine auto-immune des

hypoparathyroïdies isolées ou associées aux polyendocrinopathies auto-immunes (PEA) de type 1 ou de type 2 et de quelques cas d'hyperparathyroïdies.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

L'association d'une hypercalcémie et d'une hyperparathormonémie ou d'une hypocalcémie et d'une hypoparathormonémie peut résulter d'une pathologie auto-immune ciblant la parathyroïde. La recherche d'anticorps anti-CaSR peut donc être utile dans le cadre diagnostique de cette pathologie.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	La recherche des anticorps se fait par technique d'immunoblotting utilisant la partie extracellulaire du récepteur (antigène humain recombinant correspondant à la partie extracellulaire [1-613] de poids moléculaire de 70 kDa). Il existe aussi une technique de radio-immunoprécipitation mais non réalisée en France. La recherche des anticorps antiparathyroïdiens par IFI sur coupes non fixées de parathyroïdes humaines a été abandonnée en raison d'une sensibilité trop faible.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité est faible tant dans les hypoparathyroïdies isolées ou associées aux PEA de type 1 ou 2 où elle est estimée à 22-56 % que dans les hyperparathyroïdies primaires (7 %). La spécificité est en revanche considérée comme excellente.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Sensibilité faible.

## Bibliographie du chapitre 6

## FICHE 6.1 – Anticorps anti-îlots de Langerhans

Torn C, et al. Diabetes Antibody Standardization Program : evaluation of assays for autoantigens to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 2008 ; 1 : 846–52.

## FICHE 6.2 – Anticorps anti-IA2, anti-GAD, anti-ZnT8, anti-insuline

Lampasona V, et al. Diabetes antibody standardization program : first proficiency evaluation of assays for autoantibodies to zinc transporter 8. *Clin Chem* 2011 ; 57 : 1693–702.

Schlosser M, et al. Diabetes Antibody Standardization Program : evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia* 2010 ; 53 : 2611–20.

Torn C, et al. Diabetes Antibody Standardization Program : evaluation of assays for autoantigens to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* 2008 ; 1 : 846–52.

## FICHE 6.3 – Anticorps anti-thyroperoxydase (anti-TPO, anti-microsomes thyroïdiens)

Dayan CM, et al. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1996 ; 335 : 99–107.

Demers LM, et al. Laboratory medicine practice guidelines : laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003 ; 58 : 138–40.

McLachlan SM, et al. Genetic and epitopic analysis of thyroid peroxidase (TPO) autoantibodies : markers of the human thyroid autoimmune response. *Clin Exp Immunol* 1995 ; 101 : 200–6.

Orgiazzi J. The spectrum of autoimmune thyroid disease (AITD). *Ann Méd Interne (Paris)* 1999 ; 150 : 294–300.

Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Press Méd* 2012 ; 41 : e611–25.

## FICHE 6.4 – Anticorps anti-thyroglobuline (anti-TG)

Massart C, et al. Autoanticorps des maladies autoimmunes de la thyroïde. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris). Biologie médicale.* 8-1-10. 2013.

Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Presse Méd* 2012 ; 41 : e611–25.

FICHE 6.5 – Anticorps anti-récepteur de la *Thyroid Stimulating Hormone* (R-TSH)

Massart C, et al. Autoanticorps des maladies autoimmunes de la thyroïde. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris). Biologie médicale.* 8-1-10. 2013.

Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Presse Méd* 2012 ; 41 : e611–25.

## FICHE 6.6 – Anticorps anti-surrénales

Betterle C, et al. Autoimmune adrenal insufficiency and auto-immune polyendocrine syndromes : autoantibo-

dies, autoantigens and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr Rev* 2002 ; 23 : 327–64.

Chen S, et al. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in auto-immune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 ; 81 : 1871–6.

Seissler J, et al. Autoantibodies to adrenal cytochrome P450 antigens in isolated Addison's disease and auto-immune polyendocrine syndrome type II. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999 ; 107 : 208–13.

Soderbergh A, et al. Adrenal autoantibodies and organ-specific autoimmunity in patients with Addison's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996 ; 54 : 453–60.

## FICHE 6.7 – Anticorps anti-cellules productrices de stéroïdes

Betterle C, et al. Autoimmune adrenal insufficiency and auto-immune polyendocrine syndromes : autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocr Rev* 2002 ; 23 : 327–64.

Chen S, et al. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in auto-immune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 ; 81 : 1871–6.

Falorni A, et al. Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. *Fertil Steril* 2002 ; 78 : 270–9.

Uibo R, et al. Autoantibodies to cytochrome P450 enzymes P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, and P450<sub>c21</sub> in auto-immune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 ; 78 : 323–8.

## FICHE 6.8 – Anticorps anti-récepteur sensible au calcium

Brown EM, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup> -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993 ; 366 : 575–80.

Charrié A, et al. Calcium-sensing receptor autoantibodies in primary hyperparathyroidism. *Clin Chim Acta* 2009 ; 406 : 94–7.

Goswami R, et al. Prevalence of calcium sensing receptor autoantibodies in patients with sporadic idiopathic hypoparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2004 ; 150 : 9–18.

Li Y, et al. Autoantibodies to the extracellular domain of the calcium sensing receptor in patients with acquired hypoparathyroidism. *J Clin Invest* 1996 ; 4 : 910–4.

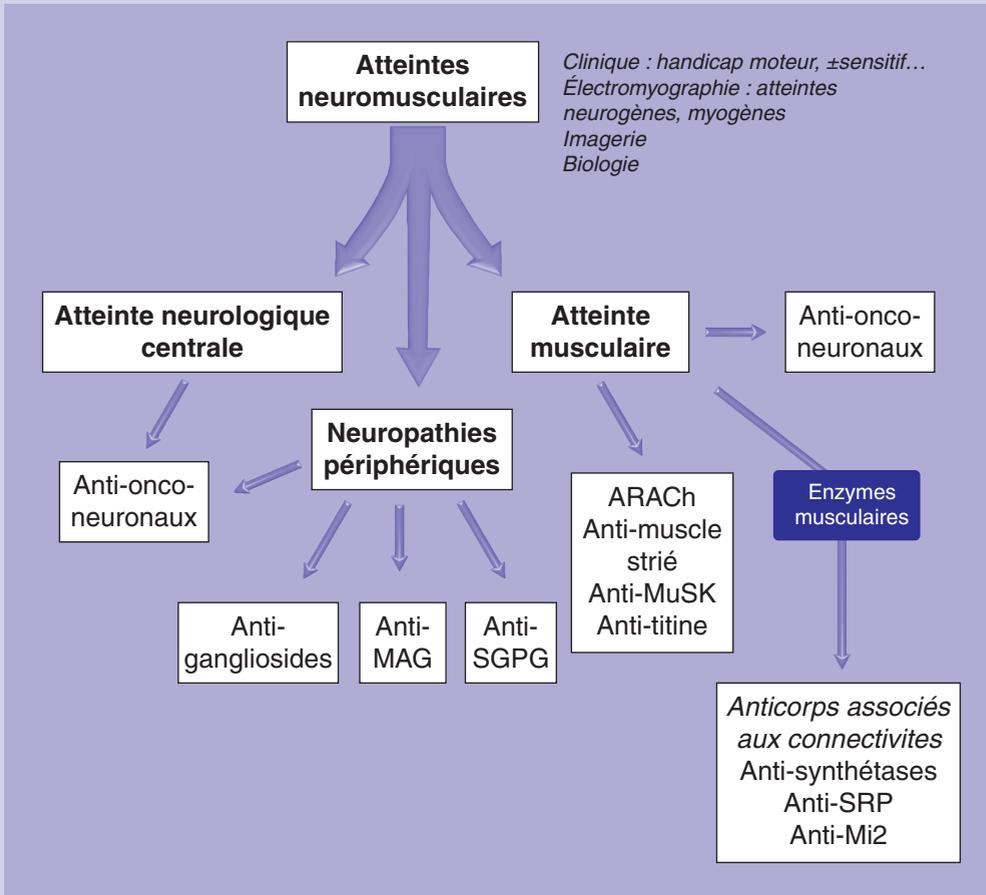
Mayer A, et al. Calcium-sensing receptor autoantibodies are relevant markers of acquired hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 ; 89 : 4484–8.

# Chapitre 7

## **Exploration des maladies neuromusculaires et neurologiques auto-immunes**

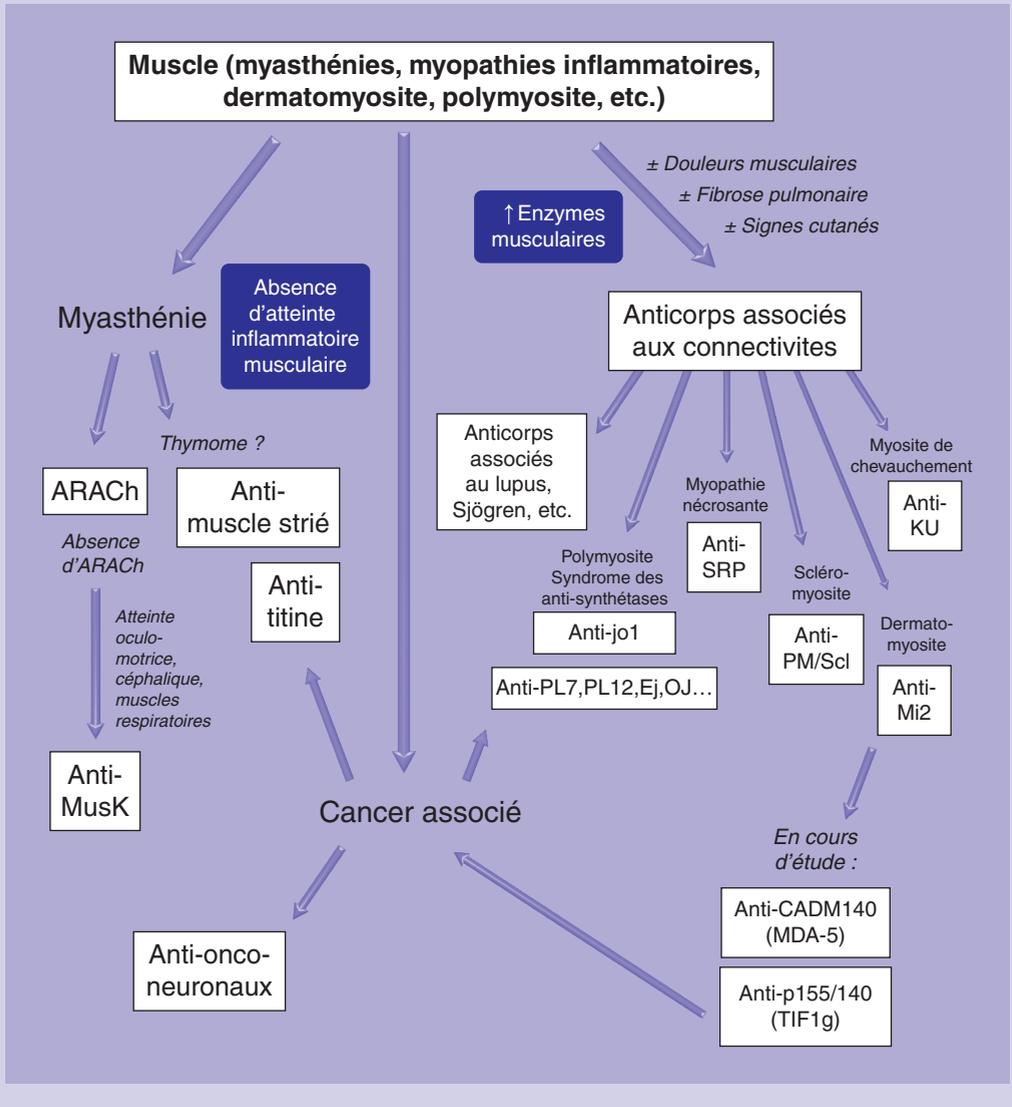
## Synopsis IX

## Prescription des marqueurs associés aux maladies neuromusculaires et neurologiques



Synopsis X

Prescription des autoanticorps associés aux atteintes musculaires



## Fiche 7.1

## Anticorps anti-cytoplasme : identification des anticorps anti-ARNt-synthétases et autres anti-antigènes cytoplasmiques

### Signification biologique du paramètre

Différents antigènes intracellulaires cytoplasmiques peuvent être la cible d'anticorps associés aux atteintes inflammatoires et/ou nécrosantes du muscle dans le cadre des connectivites :

- atteintes musculaires inflammatoires, atteintes pulmonaires (atteinte cutanée à type de dermatomyosite possible) → aminoacyl-ARNt synthétases :
  - histidyl-ARNt synthétases : cible des anticorps anti-Jo1 ;
  - thréonyl-ARNt synthétases : anticorps anti-PL7 ;
  - alanyl-ARNt synthétases : anticorps anti-PL12 ;
  - isoleucyl-ARNt synthétases : anticorps anti-EJ ;
  - glycyL-ARNt synthétases : anticorps anti-OJ ;
  - asparaginyL-ARNt synthétases : anticorps anti-KS ;
  - phénylalanyl-ARNt synthétases : anticorps anti-ZO ;
- atteintes nécrosantes (myopathie auto-immune nécrosante) → SRP (*Signal Recognition Particle*).

### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche de ces anticorps vise à mettre en évidence la présence des spécificités d'autoanti-

corps associées aux myosites, syndrome des anti-synthétases, dermatomyosites et myopathies auto-immunes nécrosantes. Certaines spécificités peuvent également être rencontrées dans le cadre de syndromes paranéoplasiques.

Les principales indications sont les atteintes musculaires cliniques (faiblesse, douleurs), biologiques (myolyse), en imagerie (IRM) ou histologiques, les atteintes cutanées (« mains de mécaniciens », papules de Gottron, érythème cutané péri-palpébral), les atteintes pulmonaires (fibrose interstitielle) et les syndromes paranéoplasiques.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche de ces spécificités est indiquée en présence d'une fluorescence cytoplasmique diffuse finement granulaire des cellules HEp-2. L'aspect peut être différent selon les préparations de cellules utilisées et selon les sérums. Si la détection sur cellules HEp-2 est négative, dans un contexte clinique évocateur, la recherche spécifique de ces anticorps peut être réalisée sur prescription du clinicien.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les anticorps anti-synthétases sont d'abord recherchés par IFI sur cellules HEP-2. Les anticorps anti-SRP donnent un aspect évocateur en IFI sur substrats de rat (foie, estomac, pancréas), proche de celui observé en présence d'anticorps anti-ribosomes. L'identification de la spécificité de l'anticorps est apportée par le test de seconde intention, immunodot, FEIA ou ALBIA. Toutes les spécificités ne sont pas disponibles avec toutes les méthodes. Recherche exclusive d'IgG.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle : immunodot. Semi-automatisée : IFI, ELISA, immunodots. Automatisée : pour certaines spécificités (FEIA, ALBIA).
<b>Type de mesure</b>	Qualitatives avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux : ces spécificités étant rares, les CIQ ne les prennent généralement pas en compte hormis dans le cas des anticorps anti-Jo1.
<b>EEQ</b>	Anti-Jo1 uniquement.
<b>Performances du test</b>	Difficiles à évaluer pour les tests récents.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les techniques d'immunodot peuvent faire l'objet de réactions non spécifiques notamment avec les anti-SRP. On décrit également comme cause d'erreur le fait de se contenter de l'IFI sur HEP-2 pour le dépistage de ces spécificités. Les anticorps anti-synthétases reconnaissent des épitopes conformationnels qui peuvent être perdus si on utilise une technique d'immunoempreinte.

## Fiche 7.2

### Identification d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles associés aux atteintes musculaires (autres que les anti-synthétases et anti-SRP)

#### Signification biologique du paramètre

Différents antigènes nucléaires ou nucléolaires peuvent être la cible d'anticorps associés aux atteintes auto-immunes et inflammatoires du muscle dans le cadre des connectivites. Ce sont les anticorps anti-Mi2 (sous-unité Mi2 à activité hélicase de la *Chromodomain Helicase DNA binding protein*, CHD4), les anti-PM/Scl et les anticorps anti-Ku (antigène formé d'un hétérodimère de deux protéines de 70 et 80 kDa fixant l'ADN). Les anticorps anti-PM/Scl reconnaissent deux cibles principales de 100 et 75 kDa au sein d'un complexe protéique de plus de dix sous-unités.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche de ces anticorps vise à mettre en évidence la présence de ces spécificités associées aux myosites, dermatomyosites, certaines formes de sclérodermies appelées « scléromyosite » et syndrome de chevauchement.

Les principales indications sont : atteintes musculaires clinique (faiblesse, douleurs) associées à des signes biologiques (myolyse), d'imagerie et histologiques. Peuvent également s'associer une atteinte cutanée avec des papules de Gottron, un érythème cutané péri-palpébral ou un épaississe-

ment (fibrose) cutané (en présence d'anticorps anti-PM/Scl). Au cours de ces pathologies, on peut également observer une atteinte pulmonaire de type fibrose interstitielle ou hypertension artérielle pulmonaire.

Ces spécificités peuvent révéler un syndrome paraneoplasique ou un syndrome de chevauchement sclérodermie-polymyosite, lupus érythémateux systémique (selon ethnies), connectivite mixte.

Classiquement, on associe les anticorps anti-PM/Scl à une scléromyosite, les anti-Mi2 aux dermatomyosites et les anti-Ku aux syndromes de chevauchement.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche de ces spécificités est indiquée en présence d'une fluorescence évocatrice en IFI sur cellules HEp-2.

Les aspects de fluorescence guident le biologiste : la recherche de ces spécificités sera donc engagée si la fluorescence nucléaire sur cellules HEp-2 est évocatrice de titre élevé supérieur au 1/640 et en l'absence d'autres spécificités d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles plus courantes. Enfin cette recherche est guidée par le contexte clinique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	En IFI sur cellules HEp-2, l'aspect de fluorescence nucléaire est évocateur. On observe une fluorescence nucléaire finement granulaire respectant les nucléoles en présence d'anticorps anti-Mi2, une fluorescence nucléolaire en présence d'anticorps anti-PM/Scl et une fluorescence mouchetée et nucléolaire en présence d'anticorps anti-Ku. La spécificité précise de l'anticorps est apportée par le test de seconde intention, immunodot, ELISA, FEIA, Ouchterlony. Recherche exclusive d'IgG.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle : immunodots. Semi-automatisée : IFI, ELISA, immunodots. Automatisée : FEIA.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Ces spécificités sont rares et cette recherche doit s'inscrire dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les techniques d'identification de la spécificité peuvent faire l'objet de réactions positives non spécifiques sans qu'on puisse identifier la cause de l'interférence. Un résultat positif en l'absence d'une fluorescence caractéristique sur HEp-2 conduit à suspecter une interférence de la méthode.

## Fiche 7.3

**Anticorps anti-récepteurs de l'acétylcholine (ARACH)****Signification biologique du paramètre**

Les anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine (ARACH) participent (au moins partiellement) au processus pathologique conduisant à la faiblesse musculaire associée à la myasthénie. Les ARACH bloquent le récepteur de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire, conduisant à un défaut de transmission de l'influx nerveux par perte de l'expression fonctionnelle des RACH. Il est décrit des formes de transmission materno-fœtale de la pathologie par passage transplacentaire des IgG ARACH.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La mise en évidence d'ARACH est un élément important de la mise en place du diagnostic de

myasthénie. Du fait de l'hétérogénéité de ces anticorps, il n'existe qu'une faible corrélation entre les titres et l'évolution de la maladie, ne conférant qu'une faible valeur pronostique aux titres élevés d'ARACH. L'évaluation des titres (leur décroissance) ne présente donc pas un intérêt majeur.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

En cas de suspicion clinique, la recherche des ARACH s'inscrit en première intention. Ils peuvent être absents des formes oculaires, céphaliques (face, cou, haut du tronc, muscles respiratoires), situations justifiant alors la recherche d'autres spécificités (anti-MuSK, notamment) (cf. Fiche 7.4).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	La technique utilisée est un RIA dans lequel est réalisée une immunoprécipitation des complexes formés entre les anticorps du patient et du récepteur soluble de l'acétylcholine (extrait de muscle humain) complexé à l'alpha-bungarotoxine marquée par l'isotope radioactif 125 de l'iode.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui (international).
<b>Performances du test</b>	Ces anticorps sont retrouvés dans près de 80–90 % des formes généralisées et 60 % des formes oculaires pures.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Des faux positifs à taux faibles ont été décrits au cours des connectivites (généralement $\leq 1,5$ fois le seuil). Limites : utilisation de l'iode 125 ( <sup>125</sup> I).

## Fiche 7.4

### Anticorps anti-MuSK, anti-muscle strié et anti-titine

#### Signification biologique du paramètre

La tyrosine kinase spécifique du muscle (MuSK) est une protéine qui participe à l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine et à la transmission du signal de stimulation musculaire. La présence d'anticorps anti-MuSK au cours de la myasthénie a été décrite à partir des années 2000. Leur identification prend tout son intérêt dans les formes séronégatives (absence d'ARACH).

La titine est une très grande protéine (3000 kDa, son nom vient de « Titan ») filamenteuse présente dans le sarcomère. Elle participe à l'élasticité du muscle. Elle constitue une des cibles des anticorps anti-muscle strié, tout comme les récepteurs de la ryanodine vis-à-vis desquels des autoanticorps ont été décrits.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche des anticorps anti-MuSK s'inscrit dans le cadre du diagnostic des myasthénies séronégatives (sans ARACH) (cf. [Fiche 7.3](#)), notamment dans les atteintes limitées à la tête (formes oculomotrices), au haut du tronc et aux muscles diaphragmatiques (atteinte des muscles respira-

toires). La présence d'anticorps anti-MuSK est associée à des formes cliniques particulières résistantes aux thérapeutiques conventionnelles.

Les anticorps anti-muscle strié constituent de bons marqueurs de thymome associé à la myasthénie (80 % des myasthénies avec thymome), surtout chez le sujet jeune ou en présence de formes plus sévères.

La recherche des anticorps anti-titine s'inscrit dans la recherche de thymome associé ou non aux manifestations de myasthénie. La présence d'anticorps anti-titine semble traduire un pronostic plus sévère et un mode de révélation plus tardif de la myasthénie.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

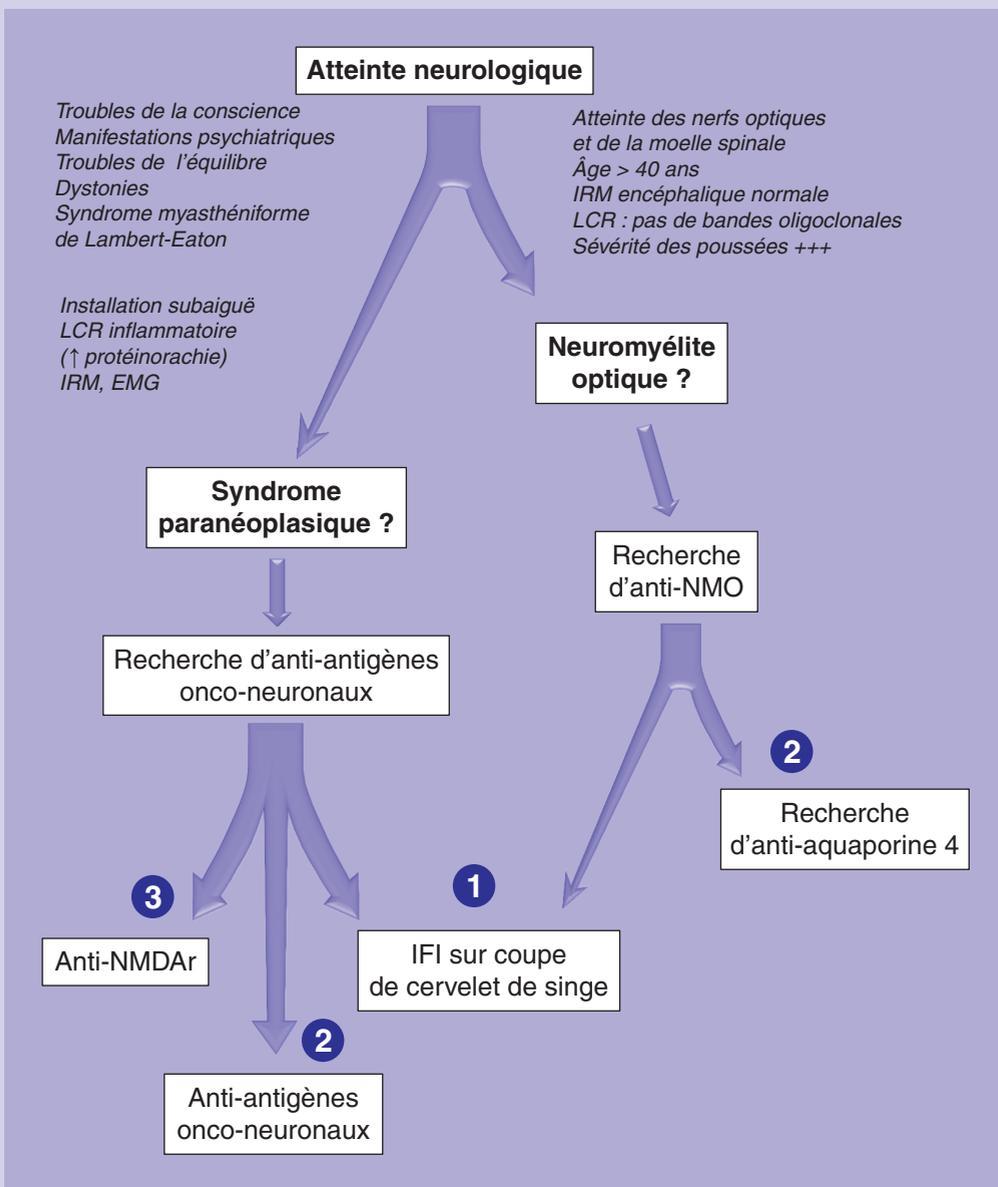
Ces analyses s'inscrivent en seconde voire troisième intention et ne justifient pas une recherche systématique.

Seul un nombre limité de centres ont l'expertise requise pour les rechercher. La recherche de ces anticorps ne remplace pas les approches conventionnelles par imagerie de la loge thoracique antérieure pour le dépistage d'un thymome.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les anticorps anti-muscle strié (myofibrilles du muscle strié) sont recherchés par IFI sur diaphragme de rat ou de singe. Les anticorps anti-MuSK, anti-titine et anti-récepteurs de la ryanodine sont détectés par méthode RIA. Des techniques utilisant des traceurs froids sont en développement.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Selon la littérature, 60–70 % des patients présentant une myasthénie sans ARACH ont des anticorps anti-MuSK. On observe des anticorps anti-muscles striés chez 90 % des patients avec thymome et myasthénie, 50 % des patients avec thymome sans myasthénie et 10 % des patients avec myasthénie sans thymome. Avant 60 ans, la présence d'anticorps anti-titine est très évocatrice de thymome. L'absence de ces anticorps (quel que soit l'âge) suggère l'absence de thymome.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Il existe des myasthénies induites par la D-pénicillamine utilisée pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde dans lesquelles on peut trouver des anticorps anti-muscle strié.

Synopsis XI

**Prescription des autoanticorps associés aux maladies auto-immunes du système nerveux central**



## Fiche 7.5

# Anticorps anti-antigènes onco-neuronaux et anticorps anti-NMDARr

### Signification biologique du paramètre

La présence d'anticorps anti-antigènes onco-neuronaux traduit une dérégulation de la réponse immunitaire dirigée à la fois contre des antigènes exprimés par des cellules tumorales (cancer pulmonaire à petites cellules, sein, ovaire, testicule...) et ceux normalement exprimés au sein de constituants des systèmes nerveux central ou périphérique, voire de la plaque motrice neuromusculaire.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

La mise en évidence d'un anticorps anti-antigènes onco-neuronaux permet d'affirmer le caractère paranéoplasique du trouble neurologique et d'orienter la recherche du cancer, par exemple : anticorps anti-Hu dans le cancer pulmonaire à petites cellules, anti-Yo dans le cancer du sein ou ovarien.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche des anticorps anti-onco-neuronaux s'inscrit en première intention devant des troubles neurologiques centraux ou périphériques d'installation subaiguë associés à des anomalies du LCR (de type inflammatoire), de l'imagerie (IRM) et/ou électromyographiques. Il existe de nombreuses spécificités d'anticorps anti-antigènes onco-neuronaux. Les plus fréquentes sont recherchées de façon combinée par IFI sur cervelet de singe. Un test immunodot peut aider à identifier les cibles. Ces approches ne révèlent toutefois pas certaines spécificités comme les anti-récepteurs du NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), VGKC (*Voltage-Gated Potassium Channels*) ou VGCC (*Voltage-Gated Calcium Channel*) qui justifient la mise en œuvre de méthodes spécialisées.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	La détection des anticorps se fait par IFI sur cervelet de singe, avec une dilution de dépistage à 1/10 et titration jusqu'à l'extinction de la fluorescence. L'immunodot est utilisé pour identifier les spécificités anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, anti-amphiphysine, anti-CV2, anti-Ma2/Ta. Enfin, on peut recourir à de l'IFI sur cellules transfectées pour les anti-NMDA-R et les autres spécificités (anti-AMPA, GABA...). Recherche exclusive d'IgG.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles semi-automatisables.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui (anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri).
<b>Performances du test</b>	La recherche par IFI requiert une grande expertise de lecture.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Il est important de réaliser une IFI sur cervelet de singe car elle peut révéler des aspects de fluorescence associés à des spécificités non révélées par l'immunodot. Elle est également plus sensible que l'immunodot. Elle est toutefois sujette à de nombreuses interférences par des anticorps antinucléaires ou anti-mitochondries. L'immunodot manque de sensibilité et peut présenter des problèmes de spécificité (positifs non confirmés par IFI ou autres dots commerciaux). Il existe enfin d'authentiques syndromes paranéoplasiques sans anticorps anti-antigènes onco-neuronaux.

## Fiche 7.6

## Anticorps anti-NMO (neuromyéélite optique) et anticorps anti-aquaporine de type 4

### Signification biologique du paramètre

Dans le cadre des atteintes inflammatoires neurologiques centrales, il est utile pour la prise en charge thérapeutique de distinguer la sclérose en plaques de la neuromyéélite optique (syndrome de Devic). Les aquaporines sont des protéines formant des pores impliqués dans le transport de l'eau au travers des cellules. L'aquaporine 4 est reconnue par les anticorps NMO-IgG.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

S'il n'existe pas de marqueur sérologique de la sclérose en plaques, la mise en évidence d'anticorps

NMO-IgG est utile à l'établissement du diagnostic et à la prise en charge thérapeutique du syndrome de Devic.

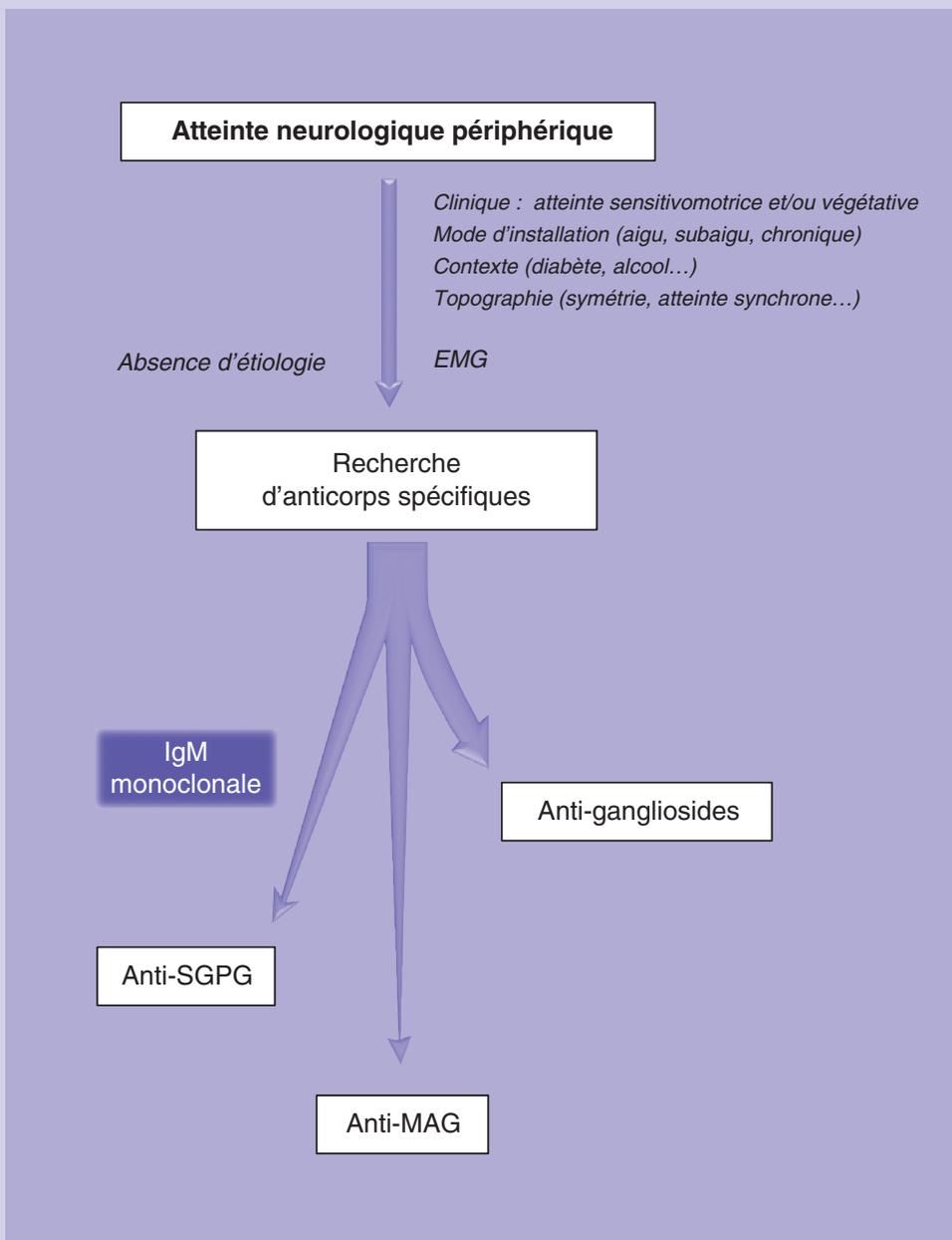
### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La prescription des anticorps NMO-IgG s'inscrit en première intention devant des manifestations évocatrices du syndrome de Devic (atteintes médullaires et névrite optique).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Une technique d'IFI est utilisée pour détecter les NMO-IgG sur coupe de cervelet de singe et les anticorps anti-aquaporine 4 sur cellules transfectées. La cytométrie en flux peut également être utilisée sur les cellules transfectées. Recherche exclusive d'IgG. Cette recherche requiert une expertise limitant sa réalisation aux laboratoires spécialisés.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité est de 50 à 70 % et la spécificité supérieure à 95 %. Il existe des formes cliniques de syndrome de Devic sans anti-NMO-IgG et sans anti-aquaporine 4.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La lecture des aspects d'immunofluorescence indirecte sur cervelet de singe justifie d'une expérience de lecture.

Synopsis XII

**Prescription des autoanticorps associés aux maladies auto-immunes du système nerveux périphérique**



## Fiche 7.7

**Anticorps anti-gangliosides****Signification biologique du paramètre**

Les gangliosides sont des glycosphingolipides membranaires comprenant une partie céramide membranaire et une partie pouvant interagir avec des autoanticorps. Ils comprennent un à quatre groupements sucrés et un à quatre groupements d'acides sialiques composant des gangliosides mono-(M), di-(D), tri-(T) ou quadri-(Q)-sialylés. L'expression de certains gangliosides est enrichie au niveau du système nerveux, particulièrement au sein des nœuds de Ranvier. Ils interagissent, à ce niveau, avec de nombreux partenaires moléculaires tels que les canaux ioniques et les glycoprotéines d'adhérence. Des épitopes sont partagés entre différents gangliosides et des agents pathogènes, tels que le lipopolysaccharide (LPS) de *Campylobacter jejuni* et des protéines virales du virus d'Epstein-Barr. La présence d'anticorps anti-gangliosides est rapportée au cours des neuropathies périphériques motrices avec bloc de conduction (NMBC) ou sans bloc de conduction. On les décrit également dans le cadre de neuropathies périphériques sensitives intégrées ou non à un tableau plus complexe qui associe agglutinines froides, IgM monoclonale, ophtalmoplégie et ataxie (CANOMAD, rarement complet). L'activité autoanticorps est parfois portée par des immunoglobulines monoclonales, le plus souvent d'isotype IgM.

Le deuxième domaine de pathologies associées aux anticorps anti-gangliosides est celui des polyradiculonévrites aiguës, telles que le syndrome de Guillain-Barré, caractérisées par une atteinte axonale avec une présentation clinique motrice (AMAN, *Acute Motor Axonal Neuropathy*) ou à prédominance motrice AMSAN (*Acute Motor Sensory Axonal Neuropathy*) et des variants caractérisés par une atteinte ophtalmologique associée à une atteinte radicaire (syndrome de Miller-Fischer) ou isolé (syndrome de Bickerstaff). Plus rarement, on observe des anticorps antigangliosides dans les cas de polyradiculonévrites aiguës démyélinisantes (pourtant les plus fréquentes en France) et en cas de polyradiculonévrite chro-

nique. Ces anticorps pourraient altérer la transmission nerveuse ou induiraient des lésions par activation de la cascade du complément et de macrophages recrutés.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche des anticorps anti-gangliosides est utile au diagnostic des syndromes de Guillain-Barré et de ses variants, et de certaines neuropathies motrices ou sensitives chroniques. Leur intérêt dans le suivi et la prise en charge thérapeutique n'est pas prouvé. Le profil de réactivités varie en fonction de la pathologie du fait du partage d'épitopes entre les gangliosides. L'isotype des anticorps peut être IgG, IgM ou IgA.

La recherche des anticorps anti-gangliosides est indiquée dans trois conditions.

Dans le cadre des neuropathies avec ou sans bloc de conduction, on doit rechercher des IgM anti-GM1. Leur fréquence varie entre 30 et 80 % en fonction des techniques utilisées et de l'expérience du laboratoire. Les anticorps reconnaissent souvent un épitope partagé avec le GD1b, mais sa recherche n'a pas d'intérêt médical majeur. Le taux n'est pas indicateur de réponse thérapeutique aux immunoglobulines intraveineuses. Les taux d'anticorps ne varient pas sous traitement. On peut également observer des anticorps anti-GM1 d'isotype IgG en cas de neuropathies motrices chroniques sans bloc de conduction, généralement sensibles au traitement par immunoglobulines intraveineuses.

Dans le cadre des neuropathies sensitives, il est indiqué de rechercher des IgM anti-GD1b qui reconnaissent un épitope disialylé commun avec le GT1b, GQ1b et le GD3 mais non partagé avec le GM1. L'activité est le plus souvent portée par une IgM monoclonale, souvent discrète et qui peut ne pas être détectée en routine dans 50 % des cas. Il n'y a pas de corrélation entre le titre des anticorps et la gravité clinique ni de modification des titres sous traitement.

Le profil des gangliosides reconnus est plus diversifié dans le cadre des polyradiculonévrites aiguës. Au début de la pathologie, les anticorps sont d'isotype IgG, IgM voire IgA (non explorées en pratique). Les titres sont maximaux au début de la maladie et diminuent ensuite. Les IgG se négativent en dernier. On associe les syndromes de Guillain-Barré axonaux moteurs à la présence d'IgG anti-GM1 et anti-GD1a. Ces cas sont souvent précédés d'une infection digestive à *Campylobacter jejuni*. On peut observer des IgG anti-GD1b dans des cas de syndromes de Guillain-Barré sensitifs purs. On observe des IgG anti-GM2 dans les syndromes de Guillain-Barré sévères consécutifs à une infection à CMV qui associent une atteinte des nerfs crâniens et des troubles sensitifs prédominants. En cas d'atteinte ophtalmoplégique (syndrome de Miller-Fischer et syndrome de Bickerstaff), la présence d'anticorps IgG anti-

GQ1b constitue un marqueur spécifique. Dans les formes bulbaires, on identifie des anticorps anti-GT1a.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Deux stratégies d'identification peuvent être utilisées en routine :

- recherche d'une combinaison de spécificités sur un panel de gangliosides pour identifier un profil de réactivités, suivie de l'identification dans un deuxième temps de l'isotype (IgM ou IgG) des autoanticorps;
- recherche de façon ciblée d'une réactivité IgM ou IgG spécifique d'un ganglioside (GM1, GD1b ou GQ1b) ou un complexe de gangliosides (GM1-GalCer) en fonction du contexte clinique qui est alors nécessairement précisé par le prescripteur.

<b>Nature du prélèvement</b>	Tube sec (avec ou sans gel séparateur). La recherche dans le LCR n'a pas d'intérêt diagnostic.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les antigènes sont déposés sur différents supports : plastique, membrane PVDF, gel de silice. Le milieu de coating et la concentration de l'antigène sont des paramètres critiques. L'incubation des anticorps se fait à 4 °C pour faciliter la fixation des IgM. Après incubation, la fixation des autoanticorps est révélée avec des antisérums anti-isotype conjugués à une enzyme et une réaction colorimétrique. La lecture est soit visuelle (dot-blot) soit réalisée par un lecteur de microplaques. La méthode de dot-blot n'est pas quantitative et son interprétation difficile pour les titres faibles. Cette technique commerciale reste accessible à des laboratoires de routine qui pratiquent de petites séries. La recherche par ELISA permet une quantification par titration ou par mesure de l'intensité de la densité optique (trousses commerciales). La titration est supérieure à l'évaluation de l'intensité de la réaction, mais demande une évaluation en deux temps et est consommatrice de réactifs. Il existe enfin des méthodes en immunoempreinte sur couche mince après chromatographie et en cytométrie en flux qui permettent une meilleure mise en conformation de l'antigène, mais elles ne sont utilisées qu'en recherche. La recherche sur coupe de tissus est peu sensible mais pourrait détecter des réactivités dirigées contre d'autres antigènes.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles : ELISA, immunodots à température réfrigérée (tester l'influence du lavage automatisé pour l'ELISA).
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables. Quantitative (ELISA) : résultat rendu en unité ou en titration.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Il n'existe pas de consensus international sur la méthode et les paramètres techniques à utiliser. Globalement, 30 % des syndromes de Guillain-Barré sont associés à des anticorps anti-gangliosides et 60 % des syndromes de Guillain-Barré post-infectieux ( <i>Campylobacter jejuni</i> , CMV, mycoplasme). Seule l'identification IgG est utile. Pour, les NMBC, la sensibilité varie de 30 à 70 % en fonction des tests. Les sensibilité et spécificité des IgM monoclonales anti-gangliosides disialylés sont excellentes dans le cadre du CANOMAD. Cette recherche doit s'inscrire dans le cadre d'un RCP clinico-biologique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La qualité des antigènes utilisés dans les coffrets à disposition est un paramètre critique (origine différente des antigènes, variabilité inter-lots, altération, mauvaise qualité intrinsèque...) En cas de pathologie chronique, les taux ou titres sont stables. À titre d'évaluation inter-essais, il peut être utile de contrôler les résultats obtenus de façon itérative. En cas d'autoanticorps associés à une infection ou réactionnels à une pathologie neurologique neurodégénérative, la recherche peut se négativer à distance. On peut observer des anticorps anti-gangliosides dans des circonstances pathologiques, en particulier en cas d'épisode infectieux et associées à des pathologies neurologiques aiguës comme des crises d'épilepsies. On considère le plus souvent que les anticorps sont secondaires.

## Fiche 7.8

### Anticorps anti-myéline/MAG et anti-SGPG

#### Signification biologique du paramètre

Dans le bilan des neuropathies périphériques sensitives ou à prédominance sensitive, il est indiqué de rechercher une immunoglobuline monoclonale (le plus souvent IgM) à activité anti-MAG et/ou anti-sulfatides qui peut être associée à plusieurs entités clinico-biologiques : gammopathie monoclonale de signification inconnue (MGUS), myélome ou maladie de Waldenström. Une activité auto-immune d'isotype IgG est exceptionnelle. Le tableau clinique est celui d'un patient le plus souvent âgé présentant une neuropathie sensitive d'évolution chronique. L'analyse de l'électromyogramme (EMG) révèle un effondrement des vitesses de conduction nerveuse avec une latence distale traduisant une dispersion des signaux. L'IgM monoclonale reconnaît un épitope commun à la MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*), au sulfo-glucuronyl-paragloboside (SGPG) et au sulfo-glucuronyl-lactosaminyl-paragloboside (SGPLG). Dans certains cas, avec ou sans immunoglobuline monoclonale, on détecte des anticorps anti-SGPG alors que les anticorps anti-MAG sont négatifs. La recherche d'anticorps anti-myéline en IFI est positive en présence d'anticorps anti-MAG, avec un aspect typique périmyélinique et péri-axonal. Cette technique permet de révéler d'autres réactivités dirigées contre différents composants du nerf périphérique (axone, substance intercellulaire, épaisseur de la myéline), dépassant le cadre des neuropathies périphériques sensitives. La physiopathologie de la neuropathie anti-MAG est mal comprise. Il existe des dépôts d'immuno-

globuline monoclonale dans le nerf, identifiés sur une biopsie nerveuse. Il n'y a pas de corrélation entre le titre des anti-MAG et la sévérité. En cas de neuropathie peu évolutive (la majorité des cas), la prise en charge thérapeutique aboutit souvent à l'abstention, puisque les approches thérapeutiques sont souvent inefficaces. En cas de pathologie plus sévère, d'autre processus (inflammatoires) participent probablement aux lésions et on peut observer une amélioration sous traitement.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les anticorps anti-MAG sont à rechercher en présence d'une IgM monoclonale et d'une neuropathie sensitive ou sensitivo-motrice à prédominance sensitive, symétrique, débutant aux membres inférieurs, d'évolution chronique avec atteinte démyélinisante à l'EMG. L'IgM monoclonale est généralement de faible taux et doit être recherchée par immunofixation avec un dépôt de sérum pur. La technique en électrophorèse capillaire ne révèle pas ce type d'IgM monoclonale; aussi, en cas de doute, il est possible de rechercher l'activité anti-MAG.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche d'anti-MAG évite la réalisation d'une biopsie nerveuse. Les taux de l'activité anti-MAG suivent l'évolution en quantité du pic monoclonal. Le suivi du taux n'est indiqué que dans le cadre de protocole thérapeutique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Congeler rapidement après réception et décantation.
<b>Mode de conservation</b>	Ne pas conserver réfrigéré. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les IgM anti-myéline sont d'abord recherchées par IFI sur coupe de nerf sciatique de singe. En cas de positivité, le caractère monoclonal de la réponse IgM est recherché par IFI à l'aide d'immuns sérums anti-chaînes légères kappa et lambda. Le dosage des IgM anti-MAG est réalisé par ELISA mais ne permet pas de démontrer la restriction d'usage des chaînes légères.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles : IFI, ELISA commercial, western blot dans les laboratoires référents.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative (IFI) ou quantitative (ELISA).
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Évaluation difficile. L'IFI sur coupes de nerf sciatique de singe pour la détection des anticorps anti-myéline a une sensibilité de l'ordre de 80 % et une spécificité > 95 % en cas d'IgM monoclonale. Les ELISA anti-MAG ont une sensibilité supérieure à 95 % et une spécificité d'environ 85 % et les ELISA anti-SGPG/SGLPG une sensibilité et une spécificité supérieures à 95 %. Des faux positifs sont rapportés notamment pour des taux faibles. Cette recherche doit s'inscrire dans le cadre d'un RCP clinico-biologique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La qualité des antigènes utilisés dans les coffrets à disposition est un paramètre critique (variabilité inter-lots, altération, mauvaise qualité intrinsèque...). En cas de réponse positive, s'assurer de la présence d'une IgM monoclonale sérique par immunofixation (une réponse positive est toujours monoclonale). Il existe de grandes variabilités inter-laboratoires.

## Bibliographie du chapitre 7

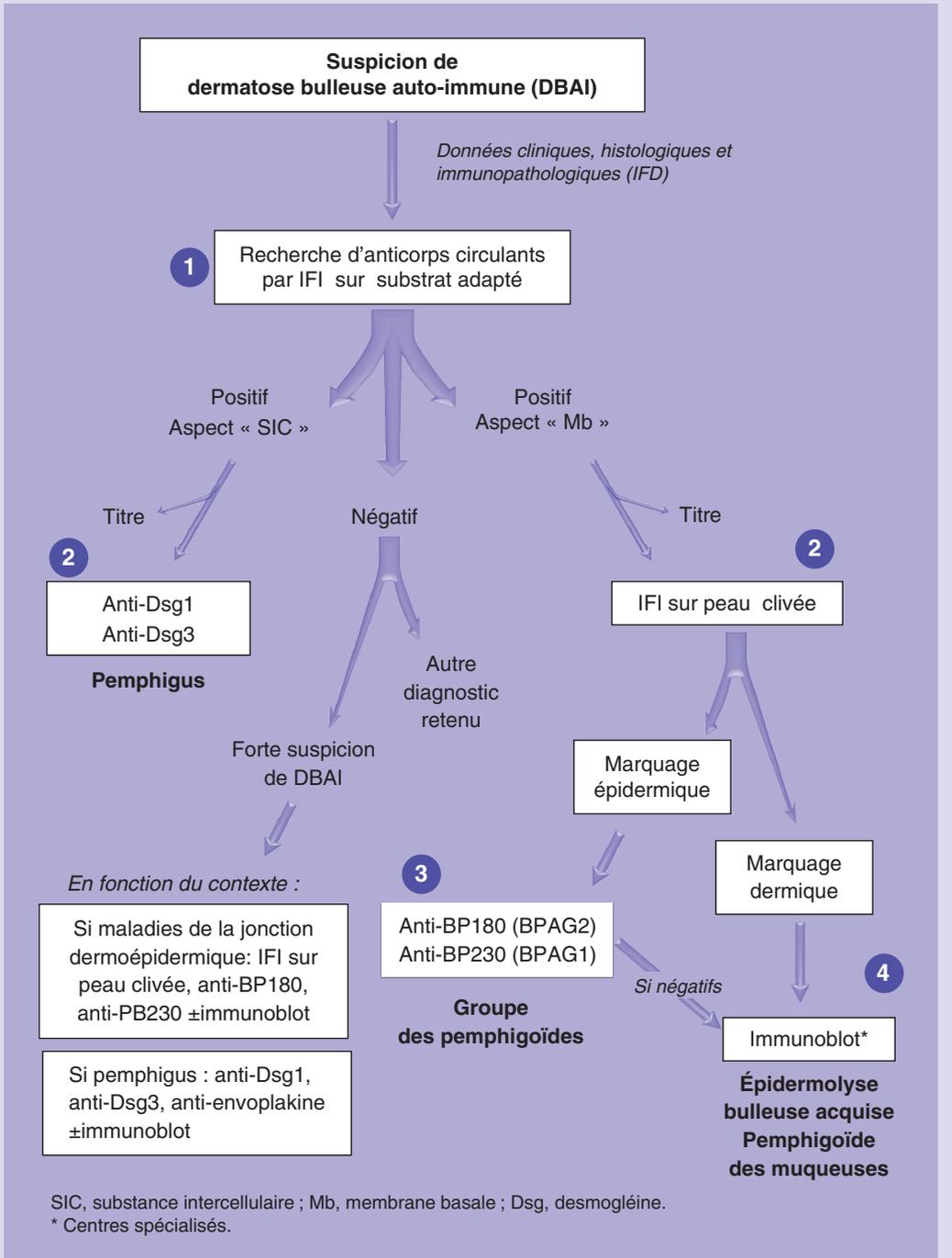
- FICHE 7.1 – Anticorps anti-cytoplasme : identification des anticorps anti-ARNt-synthétases et autres anti-antigènes cytoplasmiques  
Casciola-Rosen L. Myositis autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24 : 602–8.
- Fabien N. Anticorps dans les myopathies auto-immunes. *RFL* 2012; 444bis : 18–24.
- Fernandez C, et al. Correlation of clinicoserologic classifications of inflammatory myopathies : study of 178 cases and guidelines for diagnosis. *Medicine* 2013; 92 : 15–24.
- Liang C, et al. Necrotizing auto-immune myopathy. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23 : 612–9.
- Mammen AL. Dermatomyositis and polymyositis : clinical presentation, autoantibodies and pathogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1184 : 134–53.
- Mammen AL. Autoimmune myopathies : autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2011; 7 : 343–54.
- Marie I, et al. Comparison of long-term outcome between anti-Jo1 and anti-PL7/PL12 positive patients with antisynthetase syndrome. *Autoimmun Rev* 2012; 11 : 739–45.
- FICHE 7.2 – Identification d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles associés aux atteintes musculaires (autres que les anti-synthétases et anti-SRP)  
Casciola-Rosen L. Myositis autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24 : 602–8.
- Fabien N. Anticorps dans les myopathies auto-immunes. *RFL* 2012; 444bis : 18–24.
- Hamaguchi Y. Autoantibodies profiles in systemic sclerosis : predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 2010; 37 : 42–53.
- FICHE 7.3 – Anticorps anti-récepteurs de l'acétylcholine (ARACH)  
Fabien N, et al. Autoanticorps dans la myasthénie. *RFL* 2006; 384 : 11–5.
- Fabien N, et al. Auto-antibodies against acetylcholinesterase receptors in myasthenia gravis. *Presse Méd* 2001; 30 : 1414–8.
- Leite MI, et al. Diagnostic use of autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmunity* 2010; 43 : 371–9.
- Romi F, et al. Striation antibodies in myasthenia gravis : reactivity and possible clinical significance. *Arch Neurol* 2005; 62 : 442–6.
- FICHE 7.4 – Anticorps anti-MuSK, anti-muscle strié et anti-titine  
Farrugia ME, et al. Autoimmune mediated neuromuscular junction defects. *Curr Opin Neurol* 2010; 23 : 489–95.
- Romi F. Thymoma in myasthenia gravis : from diagnosis to treatment. *Autoimmune Dis*; 2011 : 474–512.
- Skeie GO, et al. Pathogenesis of myositis and myasthenia gravis associated with titin and ryanodine receptor antibodies. *Ann NY Acad Sci* 2003; 998 : 343–50.
- FICHE 7.5 – Anticorps anti-antigènes onco-neuronaux et anticorps anti-NMDAR  
Gozzard P, et al. Which antibody and which cancer in which paraneoplastic syndromes? *Pract Neurol* 2010; 10 : 260–70.
- Hayashi Y, et al. Paraneoplastic neurological syndrome and autoantibodies. *Brain Nerve* 2013; 65 : 385–93.
- Honnorat J, et al. New concepts in paraneoplastic neurological syndromes. *Rev Neurol* 2011; 167 : 729–36.
- FICHE 7.6 – Anticorps anti-NMO (neuromyélie optique) et anticorps anti-aquaporine de type 4  
Vincent T. Neuromyélie optique et NMO-IgG. *RFL* 2008; 38 : 21–3.
- Vincent T. Intérêt des anticorps anti-aquaporine-4 dans le diagnostic et le suivi de la neuromyélie optique. *RFL* 2012; 42 : 32–4.
- FICHE 7.7 – Anticorps anti-gangliosides  
Attarian S, et al. Chronic ataxic neuropathies associated with anti-GD1b IgM antibodies : response to IVIg therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81 : 61–4.
- Caudie C, et al. Les profils autoanticorps anti-gangliosides dans le syndrome de Guillain-Barré. *Ann Biol Clin* 2002; 60 : 589–99.
- Caudie C, et al. Preceding infections and anti-ganglioside antibody profiles assessed by a dot immunoassay in 306 French Guillain-Barré syndrome patients. *J Neurol* 2011; 258 : 1958–64.
- Chabraoui F, et al. Dot-blot immunodetection of antibodies against GM1 and other gangliosides on PVDF-P membrane. *J Immunol Methods* 1993; 165 : 225–30.
- FICHE 7.8 – Anticorps anti-myéline/MAG et anti-SGPG  
Caudie C, et al. Les autoanticorps IgM anti-MAG par ELISA Bühlmann : apport diagnostique dans 117 neuropathies périphériques auto-immunes associées à une IgM monoclonale à activité anti-SGPG/SGLPG. *Ann Biol Clin* 2006; 64 : 353–9.
- Caudie C, et al. Contribution des autoanticorps IgM anti-SGPG par ELISA Bühlmann au diagnostic de 147 neuropathies périphériques démyélinisantes associées à une IgM monoclonale. *Ann Biol Clin* 2007; 65 : 369–75.
- Jaskowski TD, et al. Immunoglobulin (Ig) M antibody against myelin associated glycoprotein (MAG) : A comparison of methods. *J Clin Lab Anal* 2004; 18 : 247–50.
- Kuijff ML, et al. Detection of anti-MAG antibodies in polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Neurology* 2009; 73 : 688–95.

# Chapitre 8

## **Exploration des dermatoses auto-immunes**

## Synopsis XIII

## Prescription des marqueurs associés aux dermatoses bulleuses auto-immunes



## Fiche 8.1

### **Anticorps anti-membrane basale cutanée, anti-BP180 et anti-BP230**

#### **Signification biologique du paramètre**

Dans le cadre des dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI), ces autoanticorps sont des marqueurs des maladies auto-immunes de la jonction dermoépidermique du groupe des pemphigoïdes : pemphigoïde bulleuse, pemphigoïde de la grossesse et pemphigoïde des muqueuses ou cicatricielle. Leur action pathogène conduit au clivage de la jonction dermoépidermique. Ils sont dirigés principalement contre les molécules BP180 (BPAG2) et/ou BP230 (BPAG1) de l'hémidesmosome de la membrane basale et souvent associés aux sous-classes IgG4 et IgG1.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche de ces anticorps est utile au diagnostic et au suivi des pemphigoïdes en complément des données cliniques, histologiques et d'immunofluorescence directe sur biopsie cutanée.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Dans le cadre du diagnostic biologique des DBAI, la recherche et le titrage des anticorps anti-membrane basale par IFI sont indiqués en première intention. La localisation du marquage (épidermique et/ou dermique) est utile au diagnostic dif-

férentiel des DBAI de la jonction dermoépidermique qui comprend les pemphigoïdes et d'autres maladies plus rares dont l'épidermolyse bulleuse acquise. Les autoanticorps observés dans la pemphigoïde bulleuse et la pemphigoïde de la grossesse sont associés à un marquage épidermique, ceux observés dans la pemphigoïde cicatricielle sont associés à un marquage épidermique et/ou dermique et le marquage est dermique dans les épidermolyses bulleuses acquises. La recherche des anti-BP180 est indiquée en première intention dans les pemphigoïdes de la grossesse. Les dosages des anti-BP180 et anti-BP230 sont réalisés en complément d'une IFI positive anti-membrane basale pour confirmer le diagnostic de pemphigoïde bulleuse. Ils peuvent aussi être recherchés en seconde intention en cas de forte suspicion clinique associée à une IFI négative ou en cas de maladie bulleuse atypique. L'immunoblot sur extraits tissulaires ou cellulaires est réservé, en troisième intention, au diagnostic différentiel des maladies bulleuses plus rares ou à la confirmation du diagnostic des pemphigoïdes dans les rares cas où la recherche des anti-BP230 et BP180 est négative en ELISA.

Les anti-BP180 sont utiles dans le suivi de la maladie. La persistance de titres élevés est un indicateur de rechute à l'arrêt du traitement. La place des anti-BP230 dans le suivi de la maladie est encore à l'étude.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	Les anticorps sont recherchés en IFI sur œsophage de singe, le plus utilisé, ou sur peau humaine, œsophage de rat ou de cobaye. L'IFI sur peau de primate clivée au NaCl est plus sensible. Un titre doit être rendu sur au moins un substrat. Les tests ELISA (anti-BP180 et anti-BP230) utilisent des antigènes recombinants. Les ELISA anti-BP180 disponibles utilisent le fragment NC16A de BP180 qui est l'épitope principal au cours des pemphigoïdes. En raison de l'absence de standardisation, les taux doivent être suivis avec la même méthode. L'immunoblot (antigènes natifs et éventuellement recombinants) est réalisé dans des centres spécialisés avec des techniques maison.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisable (automate préparateur de lames) pour l'IFI. Manuelle ou automatisable pour l'ELISA. Manuelle pour l'immunoblot.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables pour les méthodes d'IFI (titrage). Quantitative pour les méthodes ELISA (unités arbitraires). Qualitative pour l'immunoblot.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Dans la pemphigoïde bulleuse, la sensibilité est de 80 % en IFI, de 76 à 86 % pour les anti-BP180 et d'environ 60 % pour les anti-BP230. Dans la pemphigoïde cicatricielle, la sensibilité de l'IFI est seulement de l'ordre de 20 % et monte à 50 % sur peau clivée. La cible des autoanticorps est hétérogène : anti-BP180 (50 à 75 % de sensibilité), anti-BP230 (25 % habituellement associé à des anti-BP180), anti-laminine 332 (25 %), anti-intégrine $\alpha_6\beta_7$ , laminine 311, collagène VI entre autres. L'épidermolyse bulleuse acquise, diagnostic différentiel des pemphigoïdes, est associée à la présence d'anticorps anti-collagène VII. Dans la pemphigoïde de la grossesse, la sensibilité des anti-BP180 est supérieure à 90 %. La spécificité de l'ensemble des méthodes est supérieure à 95 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Variabilité des résultats selon les laboratoires et les substrats.

## Fiche 8.2

### **Anticorps anti-substance intercellulaire d'épithélium malpighien (SIC), anti-desmogléine 1 (Dsg1), anti-desmogléine 3 (Dsg3) et anti-envoplakine**

#### Signification biologique du paramètre

Dans le cadre des dermatoses bulleuses auto-immunes (DBAI), ces autoanticorps sont des marqueurs des pemphigus. Leur action pathogène conduit au clivage des kératinocytes intraépidermiques responsable du phénomène d'acantholyse. Les anticorps anti-substance intercellulaire (SIC) sont dirigés contre des molécules du desmosome : la desmogléine 1 (Dsg1), la desmogléine 3 (Dsg3) et, plus rarement, l'envoplakine. Les autoanticorps du pemphigus vulgaire sont dirigés contre la Dsg3, associés ou non aux anti-Dsg1. Les anticorps associés au pemphigus superficiel (foliacé) sont les anti-Dsg1. Le pemphigus paranéoplasique est caractérisé par la présence également d'autoanticorps anti-plakine (dont les anti-envoplakine) et éventuellement d'anti-BP230 des pemphigoïdes. Ces autoanticorps sont de classes IgG4 et IgG1.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche de ces anticorps est utile au diagnostic et au suivi des pemphigus en complément des

données cliniques, histologiques et de l'immunofluorescence directe sur biopsie cutanée.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Dans le cadre du diagnostic biologique des DBAI, la recherche et le titrage des anti-SIC par IFI sont indiqués en première intention. Les dosages des anti-Dsg1 et anti-Dsg3 sont réalisés en complément de l'identification d'anticorps anti-SIC pour confirmer le diagnostic de pemphigus. Ils peuvent être recherchés en cas de forte suspicion clinique de pemphigus alors que l'IFI reste négative ou en cas de maladie bulleuse atypique. Les anti-Dsg1 et anti-Dsg3 sont utiles au suivi car leur taux est corrélé à l'activité de la maladie et leur persistance à un titre élevé est un indicateur de rechute à l'arrêt du traitement. La mise en évidence d'anticorps anti-envoplakine est réservée aux suspicions de pemphigus paranéoplasique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. <i>Plasma acceptable exceptionnellement. Attention au facteur de dilution pour les prélèvements citratés et aux interférences si tube hépariné.</i>
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante si durée < 24 heures ; sinon, réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du tube décanté et réfrigéré : 4 semaines. Conservation du tube décanté et congelé : > 1 an. Éviter les étapes de congélation/décongélation.
<b>Principe méthodologique</b>	La recherche de ces anticorps est effectuée en IFI sur œsophage de singe (le plus sensible), de cobaye ou de rat, ou sur peau de primate supérieur. Un titre doit être rendu. L'IFI sur épithélium transitionnel (vessie de rat ou de singe) peut être réalisée dans un contexte de pemphigus paranéoplasique. Les tests ELISA (anti-Dsg1, anti-Dsg3, anti-envoplakine) utilisent des antigènes recombinants. En raison de l'absence de standardisation, les taux doivent être suivis avec la même méthode. L'immunoblot (antigènes natifs et éventuellement recombinants) est réalisé dans des centres spécialisés sur des extraits tissulaires ou cellulaires en cas de suspicion de pemphigus paranéoplasique. Il peut permettre la mise en évidence des autoanticorps dirigés contre les plakines (dont les anti-envoplakine).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisable (automate préparateur de lames) pour l'IFI. Manuelle ou automatisable pour l'ELISA. Manuelle pour l'immunoblot.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables pour les méthodes d'IFI (titrage). Quantitative pour les méthodes ELISA (unités arbitraires). Qualitative pour l'immunoblot.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	La sensibilité de l'IFI est de 80 % et celle des anti-Dsg1 et 3 de 90 % dans le pemphigus. Dans le pemphigus paranéoplasique, celle des anti-envoplakine est de 60 %. La spécificité de l'ensemble des méthodes est supérieure à 95 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les anticorps de groupe sanguin AB peuvent donner un marquage de type anti-SIC (faux positif) en IFI et doivent être neutralisés par des réactifs commerciaux.

## Bibliographie du chapitre 8

FICHE 8.1 – Anticorps anti-membrane basale cutanée, anti-BP180 et anti-BP230

Annales de dermatologie et de vénéréologie. 2011 ; 38. Entièrement dédiée aux DBAI avec une revue de la littérature et recommandations des centres de référence.

Recommandations HAS de 2011 sur les maladies bulleuses auto-immunes : [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1035510/fr/ald-hors-liste-maladies-bulleuses-auto-immunes-pemphigus](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1035510/fr/ald-hors-liste-maladies-bulleuses-auto-immunes-pemphigus).

Schmidt E, et al. Pemphigoid diseases. Lancet 2013 ; 381 : 320–2.

FICHE 8.2 – Anticorps anti-substance intercellulaire d'épithélium malpighien, anti-desmogléine 1 (Dsg1), anti-desmogléine 3 (Dsg3) et anti-envoplakine

Annales de dermatologie et de vénéréologie. 2011 ; 38. Entièrement dédiée aux DBAI avec une revue de la littérature et recommandations des centres de référence.

Recommandations HAS de 2011 sur les maladies bulleuses auto-immunes : [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1035510/fr/ald-hors-liste-maladies-bulleuses-auto-immunes-pemphigus](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1035510/fr/ald-hors-liste-maladies-bulleuses-auto-immunes-pemphigus).

Schmidt E, et al. Pemphigoid diseases. Lancet 2013 ; 381 : 320–2.

# Chapitre 9

## **Diagnostic et suivi d'un déficit de l'immunité humorale**

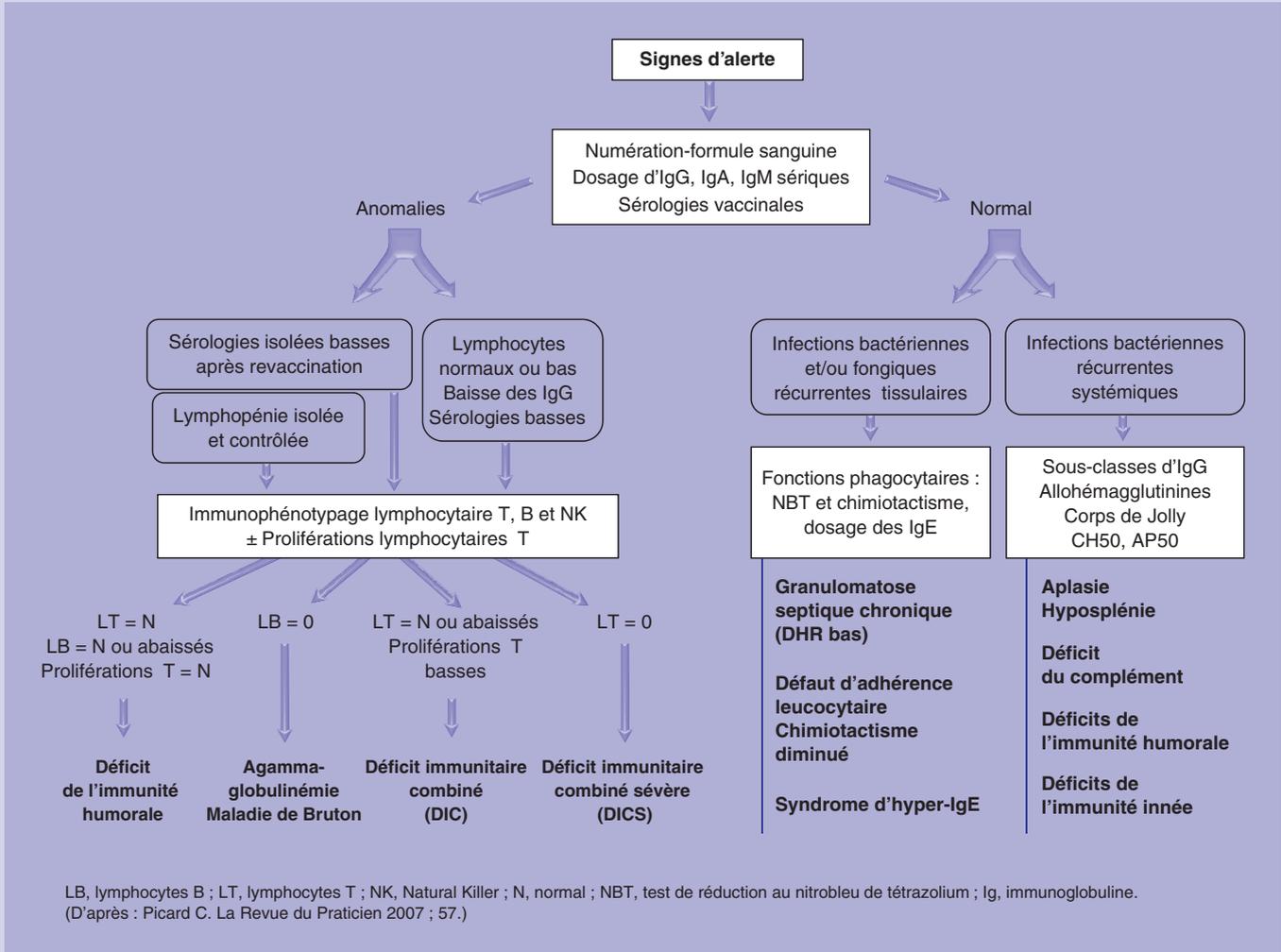
**Synopsis XIV****Exploration d'un déficit immunitaire**

Les déficits immunitaires héréditaires humoraux sont les plus fréquents de tous les déficits immunitaires héréditaires, qui sont des maladies rares, avec une fréquence estimée à moins de 1 pour 5 000 naissances. Les déficits immunitaires héréditaires doivent être diagnostiqués le plus précocement possible, en raison de la prédisposition aux infections qu'ils entraînent, pouvant engager le pronostic vital. Actuellement, plus de deux cent vingt déficits immunitaires héréditaires différents ont été décrits, avec une cause génétique identifiée pour deux cents d'entre eux. Les déficits immunitaires héréditaires humoraux sont caractérisés par un défaut complet, partiel ou sélectif de production d'anticorps ou d'immunoglobulines par les lymphocytes B. Ils rassemblent une variété d'affections liées à des mutations de gènes importants dans la différenciation, la maturation et la fonction des lymphocytes B comme, par exemple, les mutations hémizygotiques du gène *BTK* responsables de l'agammaglobulinémie liée à l'X (maladie de Bruton), les gènes impliqués dans les syndromes hyper-IgM ou les gènes impliqués dans les déficits immunitaires communs variables (DICV). Les déficits immunitaires combinés qui associent un déficit lymphocytaire T s'accompagnent souvent également d'anomalies de l'immunité humorale.

L'orientation des explorations immunologiques à réaliser dépend essentiellement de l'anamnèse

clinique précise avec les signes d'alerte (notamment la survenue d'infections sévères, récurrentes et/ou inhabituelles) et d'examens simples, réalisables en routine, tels qu'un hémogramme, un dosage pondéral des immunoglobulines et des sérologies post-vaccinales et/ou post-infectieuses.

La diversité des atteintes génétiques impliquées dans les déficits immunitaires héréditaires est responsable d'un grand nombre de phénotypes associés, en plus de la susceptibilité accrue aux infections : pathologies malignes, auto-immunes ou auto-inflammatoires, ou encore syndromes d'activation lympho-histiocytaire. Dans la majorité des cas, les symptômes apparaissent dès les premières années de vie. Toutefois, certains déficits immunitaires héréditaires tels que le DICV peuvent se manifester plus tardivement (entre 15 et 30 ans), d'où la nécessité d'évoquer le diagnostic de déficit immunitaire héréditaire à tout âge. Ce diagnostic est primordial afin d'instaurer rapidement un traitement adapté aux patients et à leur famille : antibiothérapie prophylactique, traitement substitutif, voire greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou thérapie génique dans certains cas. De plus, l'identification des défauts génétiques en cause permet l'accès à un conseil génétique pour les familles concernées et, de manière plus générale, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents.



LB, lymphocytes B ; LT, lymphocytes T ; NK, Natural Killer ; N, normal ; NBT, test de réduction au nitrobleu de tétrazolium ; Ig, immunoglobuline.  
(D'après : Picard C. La Revue du Praticien 2007 ; 57.)

## Fiche 9.1

### **Électrophorèse des protéines sériques (protéinogramme)**

#### **Signification biologique du paramètre**

L'électrophorèse des protéines sériques (EPP) permet une analyse qualitative et quantitative des six fractions majeures des protéines circulantes en fonction de leur charge électrique. Il s'agit de l'albumine et des globulines alpha 1, alpha 2, bêta 1, bêta 2 et gamma. La fraction des gammaglobulines contient les immunoglobulines.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Cet examen global est indiqué préalablement à toute autre exploration des protéines sériques,

ses indications sont donc très larges. L'EPP est prescrite devant une anomalie du taux des protéines non expliquée par l'hémodilution ou l'hémoconcentration, dans les suspicions de déficits immunitaires (diminution) ou de maladies immunoprolifératives (pic).

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Il s'agit d'un examen d'orientation à effectuer en première intention. Le délai de re-prescription doit être supérieur à 21 jours.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang prélevé sur tube sec (sérum).
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport possible du sérum à température ambiante (24 heures maximum).
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré ou congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Le principe de l'électrophorèse est une méthode physique de fractionnement des protéines ionisées lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique dans des conditions définies de force ionique, de pH, de durée et d'intensité du courant électrique appliqué. Après migration, les protéines sériques sont séparées en six fractions, de la sérualbumine la plus anodique aux gammaglobulines les plus cathodiques.</p> <p>L'électrophorèse de zone est réalisée sur un support poreux en couche mince d'agarose. Sous l'impulsion du champ électrique, en tampon alcalin à pH 8,6 à 9,2, les protéines sériques se déplacent dans le gel vers l'anode. Les fractions sont ensuite fixées dans le support par l'acide acétique et l'alcool puis révélées par combinaison avec un colorant des protéines (noir amide ou cristal violet). La densitométrie (<math>\lambda = 570</math> nm pour le noir amide) donne une quantification précise de chaque fraction individualisée.</p> <p>On peut également réaliser une électrophorèse capillaire de zone en veine liquide, dans un tampon de pH 10, sous voltage élevé. La migration s'effectue dans un capillaire de silice fondue protégé par une gaine en aluminium. Le système optique est constitué d'une lampe au deutérium, la cellule de détection comporte un filtre UV à 200 nm.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative et quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	<p>Électrophorèse de zone : sensibilité 93,5 %, spécificité 98,9 %.</p> <p>Électrophorèse capillaire : sensibilité 97,2 %, spécificité 93,7 %.</p>
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>La présence d'une hémolyse franche, d'un aspect lactescent, de fibrine, de produits de contraste iodés et de certains antibiotiques peut conduire à des pics artéfactuels. En l'absence d'uniformisation des techniques, il est préférable que le suivi d'un patient soit réalisé dans le même laboratoire.</p> <p>L'électrophorèse de zone est excellente pour visualiser directement sur le gel les tout petits pics (micropics).</p> <p>L'électrophorèse capillaire est adaptée à un protidogramme classique (routine haut débit, alimentation en continu des échantillons) mais n'est pas recommandée pour la recherche d'immunoglobulines monoclonales avec un recrutement hospitalier car elle ne donne pas de visualisation du gel et met mal en évidence les chaînes légères monoclonales isolées. Elle manque par ailleurs de souplesse avec trois modes de dilutions figés (standard, hypogammaglobulinémie, hypergammaglobulinémie). Elle ne dispense pas d'une immunoelectrophorèse ou d'une immunofixation dans 30 % des cas (douteux).</p>

## Fiche 9.2

**Dosage pondéral des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)****Signification biologique du paramètre**

Les immunoglobulines, anciennement dénommées gammaglobulines, sont les éléments principaux de l'immunité humorale, synthétisés par les plasmocytes issus de la différenciation terminale des lymphocytes B. Elles ont une fonction d'anticorps. On les trouve dans le plasma et la plupart des liquides biologiques. Leurs concentrations varient avec l'âge.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Les immunoglobulines sériques (IgG, IgA, IgM) peuvent être anormalement basses en cas de défaut de synthèse chez les patients atteints de déficit immunitaire héréditaire (cf. Synopsis XIV). Les IgG peuvent également être diminuées en cas de fuite excessive rénale (syndrome néphrotique)

ou digestive (entéropathie exsudative). Lorsque la concentration des IgG sériques est basse, des injections d'IgG (substitution Ig IV) peuvent être prescrites après évaluation du risque infectieux. Par ailleurs, chacune des classes d'immunoglobulines peut être augmentée, principalement dans certains syndromes lymphoprolifératifs B matures, au cours d'infections ou de maladies auto-immunes.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Le dosage des immunoglobulines intervient en première intention lors d'une suspicion de déficit de l'immunité humorale, qui peut être congénital ou acquis. Il est également pertinent pour le suivi du taux résiduel des IgG au cours des substitutions Ig IV ou SC. Ce dosage est réalisé également dans le suivi des syndromes lymphoprolifératifs B.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum ou plasma (EDTA) selon les instruments. Autres liquides biologiques sur indications spécifiques.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	De préférence à jeun.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré ou congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	La néphélométrie et la turbidimétrie sont les techniques les plus utilisées pour mesurer la concentration des immunoglobulines par immunoprécipitation. Un complexe immun est formé lors de l'addition à l'échantillon à doser d'un anticorps polyclonal d'origine animale spécifique d'un isotype (IgG, IgA ou IgM). La néphélométrie et la turbidimétrie consistent à mesurer l'intensité de la lumière respectivement diffractée ou transmise par ces complexes pour la relier à une concentration grâce à une gamme d'étalonnage. Il est également possible de doser les concentrations d'immunoglobulines en immunodiffusion radiale ou par une méthode ELISA.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée en néphélométrie ou turbidimétrie.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Bonnes, sauf pour les valeurs les plus basses (préférer dans ce cas la méthode néphélométrique).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Interférences : IgG d'origine maternelle chez le nouveau-né en raison du passage transplacentaire au cours du 3 <sup>e</sup> trimestre de la grossesse, substitution IgG IV ou SC, gammopathies monoclonales (valeurs erronées). L'interprétation du dosage doit tenir compte des normes établies en fonction de l'âge du patient.

## Fiche 9.3

### **Dosage des sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) et des sous-classes d'IgA (IgA1, IgA2)**

#### **Signification biologique du paramètre**

Deux isotopes d'immunoglobulines présentent un polymorphisme des chaînes lourdes définissant des sous-classes : ce sont les IgG (IgG1 à IgG4) et les IgA (IgA1 et IgA2).

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage des sous-classes d'IgG a pour objectif la recherche d'une anomalie de l'expression d'une ou plusieurs d'entre elles. Un déficit en une ou plusieurs sous-classes d'IgG est un marqueur biologique en faveur d'un déficit de l'immunité humorale, mais on ne peut parler de déficit immunitaire que si le patient présente également des manifestations infectieuses associées au déficit biologique en sous-classes. Une élévation des IgG4 associée à des signes cliniques évocateurs peut évoquer une maladie sclérosante avec hyper-IgG4. À noter qu'il n'existe pas de normes pour les valeurs inférieures des IgG4.

Le déficit en sous-classes d'IgA est une entité qui n'est pas connue. Il n'y a aucune pertinence clinique à le rechercher car il n'existe pas dans la littérature d'élément montrant le moindre intérêt à doser les sous-classes d'IgA, malgré l'existence de réactifs spécifiques (anticorps monoclonaux) permettant de le faire.

La principale indication est la suspicion de déficit en sous-classes d'IgG sur des arguments tels que : infections à répétition (plus de huit par an avant 4 ans, plus de quatre par an pour les plus de 4 ans), présence d'un déficit en IgA, d'une dilatation des bronches sans étiologie connue ou d'antécédents familiaux de déficit en sous-classes ou en une autre immunoglobuline.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Cet examen ne doit jamais être effectué en première intention et doit être prescrit après avis pédiatrique spécialisé. Il doit être réalisé après un dosage pondéral des IgG totales (cf. Fiche 9.2) et une exploration sérologique post-vaccinale (cf. Fiche 9.4) et/ou infectieuse chez des enfants âgés de plus de 20 mois. Le patient ne doit pas avoir reçu d'immunoglobulines de substitution au cours des 3 mois précédant l'analyse. Le délai de re-prescription en cas de déficit confirmé est de 1 an, car le déficit peut se normaliser spontanément. Le dosage des quatre sous-classes doit être effectué sur le même prélèvement et avec la même technique pour les déficits. Dans le syndrome d'hyper-IgG4, il convient de doser uniquement les IgG4.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang prélevé sur tube sec (sérum).
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport possible du sérum à température ambiante (24 heures maximum).
<b>Mode de conservation</b>	Après décantation, le sérum peut être conservé une semaine réfrigéré, éventuellement additionné d'azide de sodium, ou plusieurs mois congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	La technique de référence est une technique immunoenzymatique par compétition utilisant des anticorps monoclonaux anti-sous-classes d'IgG sélectionnés sur la base de leurs spécificités et affinités vis-à-vis d'IgG de myélome pures. Selon les isotypes, l'antigène utilisé pour sensibiliser les plaques est une préparation d'IgG polyclonales ou une IgG monoclonale purifiée. Le dosage peut également être réalisé en néphélémétrie ou turbidimétrie. Cette méthode, plus simple et rapide d'utilisation, n'a pas une corrélation parfaite avec l'ELISA, particulièrement pour les IgG2 et IgG3.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Différentes selon les techniques utilisées.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La présence de facteurs rhumatoïdes dans le prélèvement interfère spécifiquement avec le dosage des IgG2. Dans ce cas, une épreuve de dilution permet une évaluation correcte et l'élimination éventuelle d'un déficit.

## Fiche 9.4

### Sérologies vaccinales

#### Signification biologique du paramètre

Les sérologies vaccinales (anti-anatoxine tétanique, antidiphthérique, antipneumococcique, anti-*Haemophilus B*, etc.) permettent d'évaluer la capacité de production d'anticorps spécifiques (IgG) en réponse à une stimulation par un pathogène ou un composé vaccinal. Le dosage des anticorps vaccinaux permet de contrôler l'efficacité des vaccinations chez les patients et de diagnostiquer un déficit partiel ou complet de l'immunité humorale lorsque le nombre de lymphocytes B circulants et le taux d'immunoglobulines plasmatiques sont normaux.

Les anticorps vaccinaux peuvent être dirigés contre deux types de structures. Les anticorps de type antiprotidique sont produits après une infection ou une vaccination et nécessitent une coopération des lymphocytes B et T. Les anticorps de type antipolysaccharidique, qui ne font appel qu'aux lymphocytes B, sont produits après infection par une bactérie encapsulée (par exemple, pneumocoque) ou une vaccination par un vaccin non conjugué (par exemple, Pneumo 23). Ces derniers ne sont pas évaluables avant l'âge de 2 ans en raison d'un défaut de production physiologique de ce type d'anticorps chez le petit enfant.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les sérologies antidiphthérique, antitétanique et antipneumococcique sont suffisantes pour évaluer la réponse humorale spécifique, et il n'est pas nécessaire de multiplier les sérologies dans un bilan de déficit immunitaire héréditaire. En cas de vaccinations multiples, l'analyse d'une réponse vaccinale à un antigène protidique (tétanos, en particulier) peut suffire. Les titres protecteurs dans les populations immunocompétentes sont généralement considérés comme protecteurs dans les populations immunodéficientes. Pour la production d'anticorps antipolysaccharidiques, le dosage doit être effectué avant la vaccination par le Pneumo 23 et 1 mois plus tard. En cas de taux résiduel avant vaccination, un titre trois fois supérieur après vaccination est considéré satisfaisant. Les vaccins vivants atténués et *a fortiori* vivants sont contre-indiqués si un déficit immunitaire est suspecté ou documenté.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'un examen de première intention pour vérifier l'efficacité d'une vaccination dans les populations à risque ainsi que pour le diagnostic des déficits de l'immunité humorale et des déficits immunitaires combinés chez les sujets vaccinés.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang prélevé sur tube sec (sérum).
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport possible du sérum à température ambiante (24 heures maximum).
<b>Mode de conservation</b>	Après décantation, le sérum peut être conservé une semaine réfrigéré, éventuellement additionné d'azide de sodium, ou plusieurs mois congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	Le dosage des anticorps vaccinaux de type IgG (et/ou IgM en cas d'infection récente) est effectué par une méthode ELISA.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Variable en fonction des trousse diagnostiques.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les sérologies sont ininterprétables avant l'âge de 6 mois en raison de la persistance d'IgG maternelles pouvant entraîner des résultats faussement positifs. L'interprétation doit tenir compte du délai entre l'immunisation et la réalisation de la sérologie. En cas de substitutions Ig IV prévoir des dosages à distance du traitement.

## Bibliographie du chapitre 9

FICHE 9.1 – Électrophorèse des protéines sériques (protéinogramme)

Iffrah N, et al. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Rev Prat* 2006; 56 : 18–24.

O'Connell TX, et al. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician* 2005; 71 : 105–12.

Smith A, et al. On behalf of the UK Myeloma Forum, Nordic Myeloma Study Group and British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol* 2006; 132 : 410–51.

Szymanowicz A, et al. Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. *Ann Biol Clin* 2006; 64 : 367–80.

Varet B. Immunoglobulines monoclonales. Quel raisonnement adopter? *Rev Prat* 2006; 56 : 15–7.

FICHE 9.2 – Dosage pondéral des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)

Ritchie RF, et al. Reference distributions for immunoglobulins A, G, and M : A practical, simple and clinically

relevant approach in a large cohort. *J Clin Lab Anal* 1998; 12 : 363–70.

FICHE 9.3 – Dosage des sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) et des sous-classes d'IgA (IgA1, IgA2)

Aucouturier P, et al. Measurement of human IgG4 levels by a competitive immunoenzymatic assay with monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1984; 74 : 151–62.

Aucouturier P, et al. Distribution of IgG subclass levels in normal adult sera as determined by a competitive enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *Diagn Immunol* 1985; 3 : 191–6.

Aucouturier P, et al. Concentrations sériques des sous-classes d'IgG chez l'enfant normal. *Arch Fr Pediatr* 1988; 45 : 255–8.

Aucouturier P. Revoir le dosage des sous-classes d'IgG. *Presse méd* 2013; 42 : 253–7.

FICHE 9.4 – Sérologies vaccinales

Duchamp M, et al. Comment explorer et diagnostiquer un déficit immunitaire héréditaire. *Feuil Biol* 2012; 309 : 5–15.

# Chapitre 10

## **Diagnostic d'une dysglobulinémie**

## Synopsis XV

**Diagnostic et suivi d'une dysglobulinémie**

La plupart des maladies immunoprolifératives sont monoclonales : elles ont pour origine la transformation d'un seul lymphocyte B, qui donne naissance à un clone de cellules sécrétant des immunoglobulines. Les molécules d'immunoglobulines issues du même clone ont toutes la même séquence en acides aminés ; leur charge nette est donc homogène, contrastant avec l'hétérogénéité de charge des immunoglobulines normales. À noter toutefois qu'il peut exister une hétérogénéité intraclonale de glycosylation et/ou diverses formes de complexation ou d'agrégation, conduisant généralement à deux à trois formes maximum de l'immunoglobuline concernée, dans la grande majorité des cas une IgA ou une IgM.

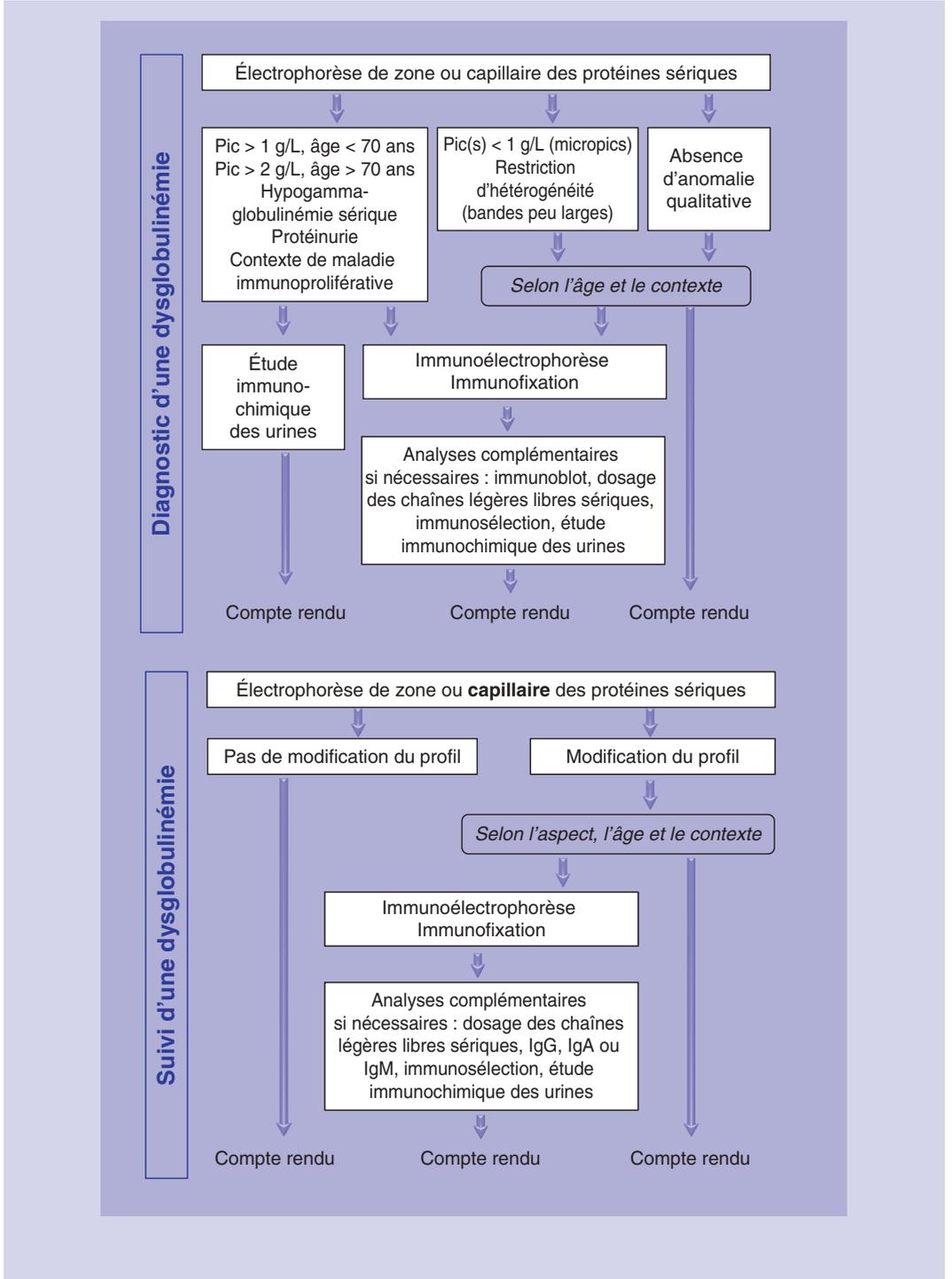
Le diagnostic biologique d'une dysglobulinémie, ou gammopathie monoclonale, repose sur la mise en évidence de deux critères, l'homogénéité de charge et la mono-isotypie, qui doivent être simultanément démontrés pour affirmer la présence d'une immunoglobuline monoclonale dans le sang et/ou les urines, à l'aide de méthodes de laboratoire couplant l'électrophorèse (préférentiellement électrophorèse de zone ou électrophorèse capillaire) à une analyse immunochimique utilisant des anti-sérums spécifiques de chaque isotype de chaînes lourdes et légères. Cette analyse fait appel à des techniques d'immunoprécipitation (immunoélectrophorèse, immunofixation), d'immunoenzymologie (immunoblot) ou d'immuno-soustraction. Les dosages pondéraux isolés des isotypes d'immunoglobulines (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) ne

permettent pas d'affirmer la présence d'une immunoglobuline monoclonale.

Le dosage des chaînes légères libres d'immunoglobulines kappa et lambda peut être utile au diagnostic lorsque les techniques d'électrophorèse, d'immunoélectrophorèse ou d'immunofixation ne permettent pas d'identifier d'immunoglobuline entière et/ou de mesurer de façon précise le pic d'immunoglobulines monoclonales. Dans le cas des myélomes à chaînes légères isolées, ce dosage est complémentaire au diagnostic et permet le suivi de la masse tumorale. C'est également le cas pour les gammopathies paucisécétrantes et les maladies à dépôt de chaînes légères (amylose AL, par exemple). Par ailleurs, la courte demi-vie des chaînes légères en fait un marqueur thérapeutique précoce. Il faut souligner la complexité méthodologique de ces dosages.

Certaines immunoglobulines monoclonales ont des activités anticorps ou des propriétés physicochimiques particulières de précipitation à des températures inférieures à 37 °C (maladies des agglutinines froides, cryoglobulines). Dans ces contextes, certaines précautions préanalytiques doivent être respectées, en particulier le prélèvement et l'acheminement au laboratoire à 37 °C.

Enfin, le diagnostic d'une dysglobulinémie devra s'accompagner du dépistage d'une atteinte rénale associée par la recherche d'une protéinurie et la caractérisation du profil de cette protéinurie, en particulier protéinurie de Bence-Jones.



## Fiche 10.1

### Caractérisation d'une immunoglobuline monoclonale

#### Signification biologique du paramètre

Les dysglobulinémies, ou gammopathies monoclonales, sont des pathologies liées à la prolifération d'un clone de lymphocytes B sécrétant des immunoglobulines entières ou des chaînes légères toutes identiques. Leur identification repose sur la mise en évidence de l'homogénéité de charge et la mono-isotypie de ces protéines par une électrophorèse et une analyse immunochimique utilisant des anti-sérums spécifiques. L'électrophorèse des protéines sériques (EPP) permet l'analyse qualitative et quantitative des fractions protéiques : albumine,  $\alpha_1$ -globulines,  $\alpha_2$ -globulines,  $\beta_1$ -globulines,  $\beta_2$ -globulines et  $\gamma$ -globulines. L'immunoélectrophorèse (IEP) et l'immunofixation (IF) permettent l'analyse qualitative des immunoglobulines. L'IEP et l'IF effectuées à l'aide d'anti-sérums spécifiques permettent l'identification des pics étroits dépistés par l'EPP. Elles permettent aussi le dépistage d'immunoglobulines monoclonales non visibles à l'EPP (propriétés migratoires ou faible taux).

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'EPP est indiquée en première ligne devant une anomalie du taux des protéines non expliquée par l'hémodilution ou l'hémoconcentration ou dans les suspicions de maladies immunoprolifératives. Dans ce dernier cas, l'EPP est le seul examen qui permette de quantifier valablement un pic d'immunoglobuline monoclonale, pour apprécier la masse tumorale et suivre des traitements. En l'absence d'uniformisation des techniques, il est préférable que le suivi d'un patient soit toujours réalisé dans le même laboratoire. L'IEP et l'IF

sont indiquées pour confirmer la clonalité et caractériser le pic. Elles permettent également l'exploration d'une hypogammaglobulinémie inexpliquée, en particulier pour l'identification d'une maladie des chaînes légères. Elles sont aussi utiles en cas d'EPP normale lorsqu'il y a une suspicion de syndrome lymphoprolifératif avec gammopathie monoclonale ou de maladies de dépôts de chaînes d'immunoglobulines monoclonales (amylose).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

L'IEP ou l'IF sont généralement prescrites en deuxième intention, après identification d'anomalies sur une EPP (cf. Fiche 9.1). Dans certaines situations très évocatrices (signes cliniques ou radiologiques d'un myélome, par exemple), elles peuvent être prescrites d'emblée. L'EPP est utilisée pour le suivi des gammopathies monoclonales. Une nouvelle prescription d'IEP ou d'IF n'est justifiée que lorsqu'une modification qualitative de l'EPP suggère une évolution ou pour valider la rémission d'une gammopathie monoclonale. Un dosage pondéral d'immunoglobulines (cf. Fiche 9.2) ne doit être effectué pour évaluer le pic que si l'EPP ne permet pas sa quantification. Ce dosage permet également d'apprécier une hypogammaglobulinémie des autres isotypes. Une hypergammaglobulinémie d'aspect diffus évoquant un caractère polyclonal ne justifie pas la prescription d'un IEP ou d'une IF. L'analyse approfondie d'immunoglobulines oligoclonales n'est généralement pas justifiée. L'IF peut remplacer l'IEP, qui peut être pratiquée à la discrétion du laboratoire dans des situations où elle peut être plus performante.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Éviter les échantillons lipémiques en prélevant si possible 2 heures après la prise d'aliments.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré jusqu'à 1 semaine ou congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>L'électrophorèse est une méthode physique de fractionnement des protéines ionisées lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique dans des conditions définies de force ionique, de pH, de durée et d'intensité du courant électrique appliqué. Après migration, les protéines sériques sont séparées en six fractions : sérumalbumine (la plus anodique), <math>\alpha_1</math>-globulines, <math>\alpha_2</math>-globulines, <math>\beta_1</math>-globulines, <math>\beta_2</math>-globulines, <math>\gamma</math>-globulines. On distingue deux techniques :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– l'électrophorèse de zone sur un support poreux en couche mince d'agarose : sous l'impulsion d'un champ électrique, en tampon alcalin à pH 8,6 à 9,2 les protéines sériques se déplacent dans le gel d'agarose vers l'anode. Ces fractions sont ensuite fixées dans le support par l'acide acétique et l'alcool puis révélées par combinaison avec un colorant des protéines (le plus souvent noir amide ou cristal violet). La densitométrie (<math>\lambda = 570</math> nm pour le noir amide) donne une quantification précise de chaque fraction individualisée ;</li> <li>– l'électrophorèse capillaire en veine liquide est réalisée dans un tampon de pH 10, sous un voltage élevé. La migration s'effectue dans un capillaire de silice fondue protégé par une gaine en aluminium. Le système optique est constitué d'une lampe au deutérium ; la cellule de détection comporte un filtre UV à 200 nm.</li> </ul> <p>L'IEP (immunoélectrophorèse) couple une électrophorèse de zone en agarose, effectuée dans un premier temps, avec une immunodiffusion en gel contre des anti-sérums de spécificités choisies. Après 24 heures d'immunodiffusion en chambre humide, les arcs de précipitation obtenus sont caractéristiques, par leurs aspects et leurs positions, des diverses protéines. Utilisée avec un anti-sérum polyvalent, l'IEP fournit un profil global des protéines, ce qui permet des appréciations d'ordre qualitatif et semi-quantitatif. Dans certains cas, elle permet de repérer des anomalies de structure (délétions) d'immunoglobulines, en rapport avec certaines pathologies par dépôt. L'IEP, bien que longue et d'interprétation délicate, est qualitativement plus performante.</p> <p>L'IF (immunofixation) est fondée sur la précipitation <i>in situ</i> des immunoglobulines, préalablement fractionnées par électrophorèse en gel d'agarose, avec des anti-sérums spécifiques de chaque isotype incubés à la surface du gel. Après lavage, les immunoglobulines sont révélées par coloration. La résolution, la rapidité et la facilité d'exécution et d'interprétation de l'IF en font la méthode la plus utilisée. De plus, elle permet le typage des chaînes légères des IgM monoclonales, qui n'est pas toujours possible directement par IEP.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle (électrophorèse en gel d'agarose), semi-automatisée (électrophorèse en gel d'agarose) et automatisée (électrophorèse capillaire).
<b>Type de test</b>	Qualitative et quantitative.
<b>CIQ</b>	CIQ commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Sensibilité et spécificité excellentes (> 90 %) pour l'EPP. L'IEP et l'IF ne donnent pas lieu au calcul de ces critères.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>Le phénomène de zone est un piège classique des réactions d'immunoprécipitation, conduisant à des erreurs d'interprétation. Il concerne plus particulièrement l'IF, en raison de l'absence des gradients de concentration formés dans les gels d'IEP. Pour l'éviter, la dilution du sérum doit être adaptée au taux des gammaglobulines totales ou du pic qu'on veut caractériser.</p> <p>La présence de fibrinogène ou de fibrine peut entraîner sur l'IF une bande artéfactuelle sur toutes les pistes.</p> <p>La précipitation d'euglobulines au niveau du réservoir de dépôt peut rendre difficile leur détection en IEP ou en IF et nécessite d'effectuer une dépolymérisation par réduction des thiols.</p>

## Fiche 10.2

## Dosage des chaînes légères libres d'immunoglobulines kappa et lambda

### Signification biologique du paramètre

Les chaînes légères libres d'immunoglobulines kappa et lambda sont synthétisées par les plasmocytes et associées aux chaînes lourdes pour former des immunoglobulines entières. Dans les pathologies impliquant ces cellules, la synthèse d'un des deux types de chaînes légères peut être excédentaire. Le dosage des chaînes kappa et lambda et le calcul du rapport  $\kappa/\lambda$  constituent un paramètre important de diagnostic et de suivi de ces pathologies.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dosage des chaînes légères est une indication formelle en cas de suspicion et pour le suivi d'un myélome ou d'un plasmocytome paucisécrétant ou à chaîne légère. C'est particulièrement le cas lorsque l'immunofixation est négative, que l'immunoglobuline monoclonale entière est en faible quantité et/ou qu'il existe des chaînes légères libres isolées. Ce dosage est également indiqué en

cas de suspicion et pour le suivi d'une amylose AL ou autre maladie de dépôt de chaînes légères.

La prescription de ce dosage est discutée ou étudiée à visée pronostique (essais cliniques) pour les myélomes et myélomes indolents à immunoglobuline entière et dans certains cas de MGUS (patients de moins de 65 ans pour lesquels existe au moins un facteur de risque, tel qu'un taux de composant monoclonal  $> 15$  g/L). Le taux de chaînes légères est, en fin de traitement, un des deux critères de définition de la réponse biologique stricte.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ces dosages sont réalisés en première intention avec l'électrophorèse et l'immunofixation/immunoélectrophorèse des protéines (cf. [Fiche 10.1](#)) dans le cadre d'une suspicion d'amylose AL ou autre maladie de dépôt de chaînes légères. C'est un examen de seconde intention après l'électrophorèse et l'immunofixation/immunoélectrophorèse des protéines dans le cadre d'une suspicion de myélome ou de plasmocytome.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. Le dosage sur plasma est possible. Le dosage dans les urines n'est pas recommandé.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Transport au laboratoire en moins de 24 heures à température ambiante.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Une semaine réfrigéré, ou congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	Dosage néphélométrique ou turbidimétrique.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Test très sensible et très spécifique, mais manque de corrélation entre les résultats quantitatifs obtenus selon les troussees.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les performances des tests varient selon les caractéristiques propres à chaque chaîne légère libre monoclonale. De fortes concentrations peuvent induire un effet zone (résultat faussement normal) nécessitant la réalisation de dilutions. De plus, il peut exister une corrélation médiocre des résultats obtenus à deux dilutions successives avec perte de linéarité.

## Fiche 10.3

**Électrophorèse des protéines urinaires****Signification biologique du paramètre**

Les urines sont naturellement dépourvues de protéines. La présence d'une protéinurie permet d'identifier une perturbation de la fonction rénale dans de nombreux contextes pathologiques. Des bandelettes spécifiques permettent de détecter facilement cette anomalie.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

L'électrophorèse des protéines urinaires permet l'analyse qualitative d'une protéinurie en précisant l'origine : glomérulaire, tubulaire ou mixte. Dans le cas d'une atteinte glomérulaire, elle permet de préciser la sélectivité de l'atteinte et d'en suivre l'évolution. Elle permet aussi de détecter les chaînes légères libres d'immunoglobulines mono-

clonales, en particulier dans les contextes d'insuffisance rénale aiguë du myélome.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

L'électrophorèse des protéines urinaires est un examen de première intention lors d'une suspicion de tubulopathie myélomateuse. Dans un tel contexte, il est urgent de mettre en route des mesures propres à limiter la progression de l'atteinte rénale, diurèse alcaline, éventuellement chimiothérapie.

C'est un examen de deuxième intention pour caractériser l'étiologie glomérulaire, tubulaire ou de surcharge d'une protéinurie.

L'électrophorèse des urines est interprétée en fonction de la protéinurie, réalisée par dosage des protéines urinaires par techniques colorimétriques ou turbidimétriques.

<b>Nature du prélèvement</b>	Urine.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Il est préférable de réaliser cet examen sur des urines de 24 heures ou, alternativement, sur une seule miction avec détermination concomitante de la créatininurie.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Urines réfrigérées.
<b>Principe méthodologique</b>	L'électrophorèse de zone des protéines urinaires est réalisée sur gel fin d'agarose. Il existe plusieurs types de gels d'agarose de résolutions différentes. Il existe également des gels formant un tamis moléculaire assurant une séparation en milieu dissociant, en fonction de la masse des protéines urinaires. Une concentration préalable des urines permet d'augmenter la sensibilité de la coloration. L'électrophorèse capillaire est également applicable à l'étude des urines, après concentration dans des dispositifs adaptés. L'intégration du profil électrophorétique permet d'évaluer les proportions des différentes fractions.
<b>Type de méthode</b>	Semi-automatisée : système d'électrophorèse et scanner d'intégration.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonnes.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Difficulté du recueil des urines de 24 heures. Sensibilité moins bonne si l'évaluation est réalisée seulement sur les urines du matin.

## Fiche 10.4

## Recherche et identification d'une protéinurie de Bence-Jones

### Signification biologique du paramètre

La présence de chaînes légères libres d'immunoglobulines dans les urines est anormale. On parlait initialement d'«albumine thermosoluble de Bence-Jones» pour désigner le précipité transitoire formé lors du chauffage de telles urines, acidifiées par l'acide acétique, vers 50–70 °C, disparaissant à l'ébullition. On utilise actuellement le terme de protéinurie de Bence-Jones pour désigner la présence de chaînes légères libres monoclonales (CLLM) dans les urines.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les CLLM sont la cause principale de toxicité rénale du myélome multiple. En effet, l'insuffisance rénale est un problème majeur de prise en charge du myélome multiple : 20 à 40 % des myélomes multiples diagnostiqués sont associés à une insuffisance rénale au moment du diagnostic ; 25 % des patients n'en présentant pas au diagnostic évolueront vers une insuffisance rénale. Il

existe une grande variabilité interindividuelle de la toxicité des CLLM.

L'électrophorèse des protéines urinaires ayant permis de mettre en évidence la charge homogène d'une CLLM, sa mono-isotypie doit alors être identifiée par immunofixation ou immunoélectrophorèse (cf. Fiche 10.1).

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

La recherche et l'identification d'une protéinurie de Bence-Jones sont un examen de deuxième intention, en particulier pour le diagnostic des myélomes à chaînes légères seules, sans immunoglobuline monoclonale sérique décelable, et, plus généralement, au cours des myélomes pour appréhender les risques de complications rénales et multiviscérales associés aux chaînes légères (tubulopathie à cylindres, en particulier). La recherche d'une CLLM est par ailleurs indiquée dans tout contexte où on peut suspecter une maladie due à une chaîne légère libre d'immunoglobuline : amylose AL, maladie des dépôts de chaînes légères, syndrome de Fanconi.

<b>Nature du prélèvement</b>	Urine
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Il est préférable de réaliser cet examen sur des urines de 24 heures ou, alternativement, sur une seule miction avec détermination concomitante de la créatininurie.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Urines réfrigérées.
<b>Principe méthodologique de l'acte</b>	La recherche et l'identification d'une CLLM sont effectuées par une électrophorèse-immunofixation ou par une immunoélectrophorèse. Une migration des protéines urinaires, éventuellement concentrées, est réalisée dans un champ électrique, qui les sépare selon leur charge. On effectue ensuite une précipitation avec des anti-sérums spécifiques contenant des anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques de la forme libre des chaînes légères kappa et lambda.
<b>Type de méthode</b>	Semi-automatisée : système d'électrophorèse puis immunoprécipitation avec des anti-sérums..
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Bonnes.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Dans certaines indications cliniques, en cas de test négatif, nécessité de réaliser une concentration des urines.

## Fiche 10.5

**Électrophorèse et caractérisation des protéines du LCR****Signification biologique du paramètre**

L'analyse du liquide céphalorachidien (LCR) est un élément important pour la mise en évidence d'une infection ou d'une inflammation du système nerveux central. La majorité des protéines du LCR provient du plasma par passage de la barrière hémato-méningée par transsudation au niveau des plexus choroïdes et de l'endothélium vasculaire, les autres protéines provenant des cellules nerveuses elles-mêmes.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

L'étude des protéines du LCR permet d'évaluer l'intégrité de la barrière hématoencéphalique — endommagée dans les méningites bactériennes et virales, les hernies discales et les tumeurs du cerveau ou du cordon médullaire — et/ou de déceler l'existence d'une réaction immunitaire locale par les cellules immunitaires qui ont infiltré le tissu nerveux. Par comparaison avec l'analyse du sérum, prélevé le même jour, on peut définir différents types de

profils et calculer différents index, par exemple le diagramme de Reiber.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Les dosages d'albumine et d'immunoglobuline G (IgG) dans le sérum et le LCR sont indispensables pour évaluer l'intégrité de la barrière hématoencéphalique et permettent de calculer différents index mettant en évidence une synthèse intrathécale d'IgG, qui traduit une réaction immunitaire spécifique développée au sein du système nerveux.

La mise en évidence d'un profil oligoclonal d'IgG (recherche de bandes oligoclonales, ou BOC) est fortement évocatrice de la sclérose en plaques (SEP), maladie dégénérative et inflammatoire. Ce profil est également retrouvé dans d'autres maladies neurologiques inflammatoires, telles que la neurosyphilis, le neuro-lupus, la neurosarcoïdose, les atteintes paranéoplasiques du système nerveux central et dans les infections méningées.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum et LCR prélevés le même jour.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	De préférence à jeun pour le sérum.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré ou congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	La néphélométrie et la turbidimétrie sont les techniques les plus utilisées pour mesurer la concentration des IgG et de l'albumine. L'isoélectrofocalisation (IEF) repose sur la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique après migration dans un gradient de pH linéaire créé par des ampholytes. Le sérum et le LCR sont analysés en parallèle après avoir ajusté les concentrations en IgG (10 à 20 mg/L selon les réactifs). La présence d'IgG est ensuite révélée par immunofixation avec un immunosérum anti-IgG marqué à la peroxydase.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée en néphélométrie ou turbidimétrie, manuelle ou automatisée pour l'IEF.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative pour les dosages en néphélométrie ou turbidimétrie. Qualitative pour l'IEF.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Bonnes pour l'IEF : sensibilité de 95 % et spécificité de 96 % dans le diagnostic de la SEP. Les IgG oligoclonales sont détectées avec une grande sensibilité (0,3 mg/L). Moins bonnes pour les index d'IgG et l'interprétation du diagramme de Reiber (sensibilité de 50 %).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Une contamination sanguine, même minime, du LCR fausse les résultats.

## Fiche 10.6

**Recherche et caractérisation d'une cryoglobuline****Signification biologique du paramètre**

Les cryoglobulines sont des immunoglobulines ou des complexes immuns précipitant au froid, parfois dès 36 °C.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Les cryoglobulines s'observent dans les gammopathies monoclonales, les syndromes lymphoprolifératifs ou, pour les complexes immuns, dans le contexte de maladies auto-immunes ou infectieuses (hépatite C). Elles peuvent entraîner des vascularites. Les signes cliniques associés sont cuta-

nés (purpura, phénomène de Raynaud), articulaires, neurologiques (neuropathies périphériques) ou rénaux. Certaines cryoglobulines mixtes comportant un composant monoclonal inclus dans des complexes immuns peuvent entraîner une glomérulonéphrite rapidement progressive.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

La recherche d'une cryoglobuline est un examen de première intention dans les situations évoquées ci-dessus. Il ne faut pas hésiter à répéter l'examen si le résultat est négatif, en présence de signes cliniques évocateurs.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum sur tube sec sans gel (risque de piéger la cryoglobuline). Prélever un volume minimum de 10 mL de sang total.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Patient à jeun depuis au moins 4 heures. Le matériel de prélèvement doit être préchauffé et les tubes maintenus ensuite à 37 °C (étuve, boîte ou pochette isotherme, thermos).
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement rapide à 37 °C du prélèvement non centrifugé.
<b>Mode de conservation</b>	Coagulation (2 à 18 heures) dans une étuve à 37 °C et centrifugation à chaud. Si l'acheminement est trop long, réaliser les étapes préanalytiques dans le laboratoire d'origine et envoyer le sérum décanté. Conservation 1 mois réfrigéré avec azide de sodium (0,01 % final).
<b>Principe méthodologique</b>	La recherche d'une cryoglobuline est macroscopique, qualitative. Elle se fait par l'observation quotidienne du sérum placé à +4 °C pendant 7 jours (relecture recommandée jusqu'à 1 mois, certaines cryoglobulines pouvant précipiter tardivement), mettant en évidence la formation d'un cryoprécipité. Certaines cryoglobulines abondantes précipitent en moins de 1 heure. La présence d'un précipité se redissolvant à 37 °C est en faveur d'une cryoglobuline. La classification des cryoglobulines repose sur l'identification de l'isotype et du caractère monoclonal, mixte ou polyclonal. Il est alors nécessaire d'isoler et de laver le cryoprécipité avant de le remettre en solution par chauffage. Le caractère pathogène d'une cryoglobuline n'est pas corrélé à la quantité de cryoprécipité : il n'est habituellement pas indiqué de réaliser un dosage, sauf dans certains cas particuliers, après avoir affirmé la positivité de la cryoglobuline.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle (précipitation à froid, western blot), semi-automatisée (immunofixation) ou automatisée (dosage).
<b>Type de mesure</b>	Qualitative (identification) et quantitative (dosage).
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Non applicable.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Non-respect des contraintes préanalytiques, particulièrement des températures. Opérations de lavage du cryoprécipité délicates. Nécessité d'une habilitation particulière des techniciens de laboratoire et d'une interprétation des résultats d'identification par un biologiste.

## Fiche 10.7

**Recherche et caractérisation d'un cryofibrinogène****Signification biologique du paramètre**

Le cryofibrinogène est un complexe associant de la fibrine, du fibrinogène, de la fibronectine, du facteur VIII et d'autres protéines plasmatiques, précipitant dans le plasma placé au froid pendant au moins 72 heures et non dans le sérum.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le cryofibrinogène, en association avec de la fibronectine et d'autres protéines plasmatiques,

est impliqué dans des phénomènes thrombotiques liés au froid (purpura, livedo, ulcération, nécrose).

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

La recherche d'un cryofibrinogène est un examen de première intention dans les situations évoquées ci-dessus. Cette recherche doit être réalisée en parallèle avec la recherche d'une cryoglobuline (cf. [Fiche 10.6](#)). Il ne faut pas hésiter à répéter l'examen si le résultat est négatif, en présence de signes cliniques évocateurs.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma prélevé sur EDTA ou citrate, pas d'héparine. Prélever un volume minimum de 10 mL de sang total.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Patient à jeun depuis au moins 4 heures. Le matériel de prélèvement doit être préchauffé et les tubes maintenus ensuite à 37 °C (étuve, boîte ou pochette isotherme, thermos).
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement rapide à 37 °C du prélèvement non centrifugé.
<b>Mode de conservation</b>	Si l'acheminement est trop long, réaliser les étapes préanalytiques dans le laboratoire d'origine et envoyer le plasma décanté. Conservation 1 mois réfrigéré avec azide de sodium (0,01 % final).
<b>Principe méthodologique</b>	La mise en évidence de cryofibrinogène se fait après avoir placé le plasma 7 jours à + 4 °C : la présence d'un précipité se redissolvant à 37 °C est en faveur d'une cryoprotéine. L'identification de cette cryoprotéine est essentielle pour confirmer la présence d'un cryofibrinogène en immunofixation après lavage et re-dissolution du cryoprécipité avec des anti-sérums spécifiques anti-fibrinogène et anti-fibronectine.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle (précipitation à froid, western blot), semi-automatisée (immunofixation).
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Non applicable.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Non-respect des contraintes préanalytiques, particulièrement des températures. Opérations de lavage du cryoprécipité délicates. Nécessité d'une habilitation particulière des techniciens de laboratoire et d'une interprétation des résultats d'identification par un biologiste.

## Fiche 10.8

**Dosage de la  $\beta_2$ -microglobuline****Signification biologique du paramètre**

La  $\beta_2$ -microglobuline est une molécule de la superfamille des immunoglobulines, constituée d'un domaine extracellulaire sans portion transmembranaire ni intracytoplasmique, associée aux chaînes alpha des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Elle est donc exprimée à la surface de la majorité des cellules nucléées de l'organisme. Elle existe également à faible concentration sous forme soluble. C'est cette forme qui est accessible au dosage.

La  $\beta_2$ -microglobuline plasmatique peut être augmentée en cas de syndrome lymphoprolifératif : myélome multiple, lymphome, leucémie lymphoïde chronique. Elle est également augmentée dans certaines pathologies auto-immunes (lupus érythémateux systémique, polyarthrite rhumatoïde) ainsi que dans l'infection par le VIH.

La  $\beta_2$ -microglobuline est filtrée par les glomérules rénaux et presque totalement réabsorbée et catabolisée au niveau des tubules proximaux. La  $\beta_2$ -microglobuline urinaire constitue donc un

indicateur de la fonction rénale, indépendant de la masse musculaire et du sexe.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage de la  $\beta_2$ -microglobuline sérique/plasmatique est un facteur pronostique (mauvais pronostic si taux augmenté), en association avec l'albumine sérique, dans les syndromes lymphoprolifératifs. Il permet également d'évaluer l'efficacité de la dialyse rénale.

Le dosage de la  $\beta_2$ -microglobuline urinaire est indiqué pour évaluer et suivre la fonction rénale, essentiellement la fonction tubulaire.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Le dosage de la  $\beta_2$ -microglobuline fait partie du bilan diagnostique des syndromes lymphoprolifératifs en raison de sa valeur pronostique. Il n'y a pas d'indication à répéter le dosage.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum ou plasma sur héparine ou EDTA ; urines.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Sérum/plasma : conservation réfrigérée pendant 8 jours ou congelé. Urines : conservation réfrigérée 2 jours ou congelé. La $\beta_2$ -microglobuline est instable dans les urines acides, le pH doit donc être ajusté entre 6 et 8.
<b>Principe méthodologique</b>	Le dosage de la $\beta_2$ -microglobuline peut être effectué en immunonéphélométrie, immunoturbidimétrie, ELISA ou chimioluminescence.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Variabiles selon la méthode utilisée.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Risque d'effet zone pour les prélèvements urinaires conduisant à une sous-estimation.

## Fiche 10.9

**Dosage des immunoglobulines D (IgD)****Signification biologique du paramètre**

Les immunoglobulines D (IgD) sont essentiellement présentes dans l'organisme sous forme transmembranaire à la surface des lymphocytes B naïfs. Bien qu'elles existent également sous forme soluble, leur concentration sérique physiologique est faible. Il existe également des myélomes à IgD sécrétant cette immunoglobuline.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

L'intérêt de leur dosage est la recherche d'une augmentation de cette concentration sérique dans

les syndromes hyper-IgD accompagnant certains déficits en mévalonate kinase, enzyme impliquée dans le métabolisme du cholestérol.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Il s'agit d'un dosage de première intention en cas de suspicion de déficit en mévalonate kinase. Une augmentation des IgD d'au moins deux fois la normale est un argument supplémentaire pour ce diagnostic.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Sans particularité.
<b>Contraintes de transport</b>	Transport à température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Sérum réfrigéré ou congelé.
<b>Principe méthodologique de l'acte</b>	Le dosage peut être réalisé en immunodiffusion radiale (IDR), en turbidimétrie, en immunonéphélémétrie ou en ELISA.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle (IDR), semi-automatisée (ELISA) ou automatisée (turbidimétrie, néphélémétrie, ELISA).
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Oui, commercial.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Performances variables en fonction de la trousse et de la technique utilisées.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	En néphélémétrie, turbidimétrie et IDR, phénomène d'excès d'antigène par dilution inadéquate du sérum.

## Bibliographie du chapitre 10

## FICHE 10.1 – Caractérisation

d'une immunoglobuline monoclonale

Ifrah N, et al. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Rev Prat* 2006; 56 : 18–24.O'Connell TX, et al. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician* 2005; 71 : 105–12.Smith A, et al. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma. 2005. *Br J Haematol* 2006; 132 : 410–51.Szymanowicz A, et al. Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006; 64 : 367–80.

FICHE 10.2 – Dosage des chaînes légères libres d'immunoglobulines kappa et lambda

Dimopoulos M, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup : report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011; 117 : 4701–5.Ozsan GH, et al. Serum free light chain analysis in multiple myeloma and plasma cell dyscrasias. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7 : 65–73.

FICHE 10.3 – Électrophorèse des protéines urinaires

Le Bricon T. Identification et dosage des protéines urinaires au laboratoire d'analyses. *Ann Biol Clin (Paris)* 2002; 60 : 525–40.Raidelet L, et al. Exploration de la protéinurie au laboratoire. *RFL* 2013; 43 : 75–82.

FICHE 10.4 – Recherche et identification

d'une protéinurie de Bence-Jones

Le Bricon T. Identification et dosage des protéines urinaires au laboratoire d'analyses. *Ann Biol Clin (Paris)* 2002; 60 : 525–40.Raidelet L, et al. Exploration de la protéinurie au laboratoire. *RFL* 2013; 43 : 75–82.

FICHE 10.5 – Électrophorèse et caractérisation des protéines du LCR

Gillain N, et al. Interprétation de l'index IgG et du diagramme de Reiber par Protis 2 dans les maladies inflammatoires du système nerveux central. *Immun Anal Biol Special* 2009; 24 : 135–47.

FICHE 10.6 – Recherche et caractérisation d'une cryoglobuline

Brouet J-C, et al. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974; 57 : 775–88.Intrator L, et al. Cryoglobulines : méthode de détection et interprétation. In : *Cahier de formation Biologie médicale Bioforma*; 2003. p. 28.Kolopp-Sarda MN, et al. Protéines cryoprécipitantes en pathologie : cryoglobuline et cryofibrinogène. *RFL* 2012; 444 : 53–62.Ramos-Casals M, et al. The cryoglobulinaemias. *The Lancet* 2012; 379 : 348–60.

FICHE 10.7 – Recherche et caractérisation d'un cryofibrinogène

Amdo TD, et al. An approach to the diagnosis and treatment of cryofibrinogenemia. *Am J Med* 2004; 116 : 332–7.Kolopp-Sarda MN, et al. Protéines cryoprécipitantes en pathologie : cryoglobuline et cryofibrinogène. *RFL* 2012; 444 : 53–62.Saadoun D, et al. Cryofibrinogénémies. *Rev Med Int* 2011; 32 : 287–91.FICHE 10.8 – Dosage de la  $\beta_2$ -microglobulineBethea M, et al. Beta 2-microglobulin : its significance and clinical usefulness. *Ann Clin Lab Sci* 1990; 20 : 163–8.Schardijn GH, et al. Beta 2-microglobulin : its significance in the evaluation of renal function. *Kidney Int* 1987; 32 : 635–41.

FICHE 10.9 – Dosage des immunoglobulines D (IgD)

Chen K, et al. The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr Opin Immunol* 2011; 23 : 1–8.Stoffels M, et al. Hyper-IgD syndrome or mevalonate kinase deficiency. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23 : 419–23.

# Chapitre 11

## **Exploration des maladies associées au complément**

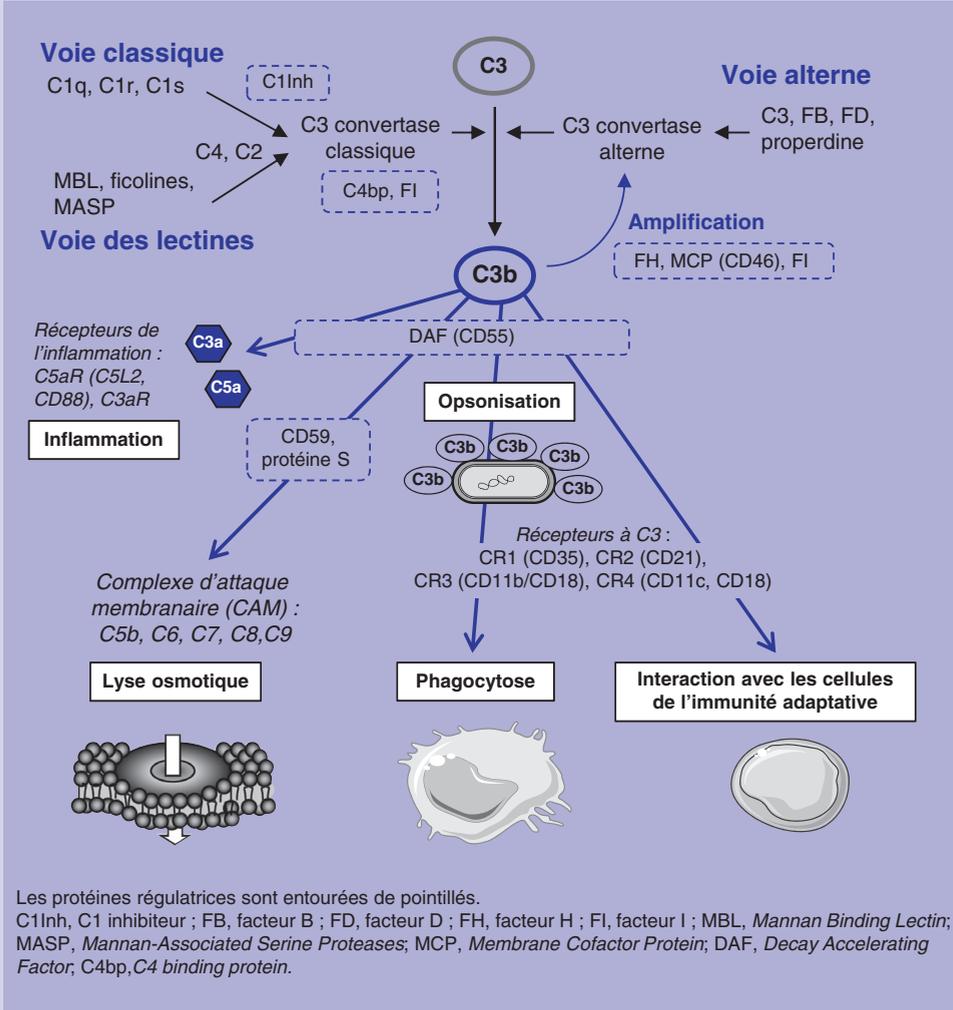
**Synopsis XVI****Exploration du système du complément**

Le système du complément est un composant important du système immunitaire impliqué dans la réponse innée et la lutte anti-infectieuse, mais également dans la modulation de l'immunité adaptative. Acteur prépondérant de la modulation de l'inflammation, le système du complément est impliqué dans les mécanismes physiopathologiques d'une grande variété de maladies, du fait d'un excès d'activation, d'un défaut de régulation ou de la combinaison des deux mécanismes.

Le système du complément est composé d'environ une trentaine de protéines circulant dans le plasma et de récepteurs membranaires présents à la surface de nombreux types cellulaires. Ces protéines sont impliquées dans la cascade d'activation (activités enzymatiques), dans la régulation ou sont des récepteurs liant des fragments d'activation. Les trois voies, voie classique, voie alterne

et voie des lectines, sont activées par des composants chimiques spécifiques. Ces trois voies convergent en formant des complexes enzymatiques, les C3 convertases, qui vont cliver la protéine centrale du système du complément, le C3, et produire du C3b. C3b initie alors différentes voies effectrices du complément à l'origine de la diversité de ses fonctions. L'ensemble du système est étroitement régulé par un réseau de protéines plasmatiques et membranaires intervenant à différents niveaux. Des perturbations de ce système, liées à des anomalies héréditaires ou acquises (dont la production d'autoanticorps ciblant des composants du complément), sont associées à différentes pathologies. Les principales situations cliniques nécessitant une exploration du complément et un schéma d'interprétation des résultats des dosages de screening sont proposés dans les tableaux ci-après.

**Schéma général du système du complément.**



## Explorations en fonction des situations cliniques et leurs objectifs.

Principales situations cliniques	Exploration	Objectifs de l'exploration
Maladies auto-immunes (principalement : lupus érythémateux systémique, vascularite urticariante)	Première intention : CH50, C3, C4 Deuxième intention : FB, C1q, C2, anticorps anti-C1q	Recherche d'un déficit en protéine de la voie classique Recherche d'un syndrome d'activation par la voie classique
Infections à répétitions Infection à méningocoque	Première intention : CH50, C3, C4, AP50 Deuxième intention : C1 (q, r, s), C2, C5/C6/C7/C8/C9, properdine, voie des lectines	Recherche d'un déficit en protéine de la voie classique, de la voie finale commune et en properdine Éventuellement, déficit en lectines
Glomérulopathies (SHU atypique, glomérulopathies à C3)	Première intention : CH50, C3, C4, FB, FH, FI, CD46, anticorps anti-FH + C3Nef (si glomérulopathie à C3) Deuxième intention : études génétiques	Recherche d'anomalie héréditaire ou acquise de la régulation de la voie alterne du complément
Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN ou syndrome de Marchiafava-Michelli)	Première intention : étude de l'expression membranaire de CD59, CD55 ± CD14*, CD16*, CD24* à la surface des globules rouges ± des granuleux ± des monocytes	Recherche et quantification de clone HPN identifié par l'absence d'expression des protéines GPI-ancrées
Angioœdème	Première intention : CH50, C3, C4, C1Inh antigénique et fonctionnel Deuxième intention : anticorps anti-C1Inh, voie des bradykinines	Recherche d'un déficit en C1Inh héréditaire ou acquis Bilan étiologique d'un œdème bradykinique

\* Protéines ancrées à la surface par un groupement GPI mais ne faisant pas partie du système du complément.

## Interprétation des résultats du bilan de dépistage CH50, C3, C4, et examens complémentaires de seconde intention à effectuer en fonction du contexte clinique.

CH50 (%)	C3 (%)	C4 (%)	Interprétation	Examens complémentaires
Normal	Normal	Normal	Normal	Aucun
Augmenté	Augmenté	Augmenté	Syndrome inflammatoire	Aucun
Abaissé	Abaissé	Abaissé	Consommation par la voie classique ± par la voie alterne Insuffisance hépatocellulaire Fuite protéique	Dosage FB
Abaissé	Abaissé	Normal	Consommation voie alterne	Dosage FB, FH, FI, CD46, anticorps anti-FH, C3Nef (glomérulopathie à C3)
Normal	Normal	Abaissé	Déficit en C1Inh Déficit partiel en C4 Cryoglobulinémie	C1Inh antigénique et fonctionnel Phénotypage C4 Recherche de cryoglobuline
Abaissé	Normal	Normal	Activation <i>in vitro</i> Déficit hétérozygote en C2	Contrôle avec respect du préanalytique Étude génétique du gène de C2
Indosable	Normal	Normal	Déficit homozygote en une protéine de la voie classique ou de la voie terminale Traitement par anti-C5	Dosages antigéniques ± fonctionnels

## Fiche 11.1

**Dosage fonctionnel de la voie classique du complément****Signification biologique du paramètre**

Ce dosage explore la capacité d'activation des protéines plasmiques du complément impliquées dans la voie classique et dans la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM).

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage de l'activité hémolytique du complément se fait dans un contexte de :

- recherche de déficit héréditaire de l'immunité innée : plus précisément dans un contexte d'infection à germe encapsulé (déficit en une protéine de la voie classique et/ou de la voie finale commune) ou de maladie auto-immune (voie classique);

- suivi d'une maladie auto-immune à complexes immuns (lupus érythémateux disséminé) induisant un syndrome de consommation par la voie classique;
- diagnostic et suivi d'un angioœdème par déficit en C1 inhibiteur;
- suivi du traitement par anticorps thérapeutique anti-C5 (éculizumab).

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce dosage se fait en première intention et conjointement avec les dosages antigéniques de C3 et C4 (cf. [Fiche 11.3](#)).

<b>Nature du prélèvement</b>	Variable selon les laboratoires (plasma EDTA ou citrate, sérum) et les techniques utilisées. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Pour le sérum et l'EDTA : centrifugation à froid, aliquotage du sérum ou du plasma et conservation à $-80^{\circ}\text{C}$ avec transport en carboglace. Pour le citrate : conservation du sang total 48 heures à température ambiante ; conservation d'aliquotes de plasma à $-80^{\circ}\text{C}$ .
<b>Méthodologie générale du test</b>	Dosage du CH50 : mesure de la lyse d'érythrocytes hétérologues (globules rouges de mouton) recouverts d'anticorps (formant ainsi un modèle de surface activatrice de la voie classique) en présence du plasma à tester. Ce test détermine le volume de plasma du patient capable de lyser 50 % des globules rouges. Il existe deux méthodes principales : la première, en point final, utilise une dilution de l'échantillon à doser ; la technique en cinétique mesure l'hémolyse en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'un pool de plasma, traité dans les mêmes conditions que l'échantillon. Il existe des techniques ELISA dans lesquelles une activation de l'échantillon est effectuée <i>in vitro</i> en utilisant un activateur spécifique de la voie classique (immunoglobulines), suivie d'un dosage de la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM). Les techniques automatisées utilisent des microparticules contenant une enzyme libérée en cas de formation du CAM. Il existe également des techniques d'hémolyse en immunodiffusion radiale.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisée ou automatisée selon les laboratoires.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	1 EEQ annuel international pour les laboratoires spécialisés.
<b>Performances du test</b>	Les intervalles des valeurs de référence sont propres à chaque laboratoire et à chaque technique. La sensibilité est très variable selon les techniques utilisées. Les techniques automatisées sont moins sensibles dans les valeurs basses.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Importance de l'étape préanalytique : risque d'activation <i>in vitro</i> donnant un résultat faussement diminué.

## Fiche 11.2

### Dosage fonctionnel de la voie alterne du complément

#### Signification biologique du paramètre

Ces dosages explorent la capacité d'activation des protéines plasmatiques du complément impliquées dans la voie alterne et dans la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM).

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dosage de l'activité de la voie alterne du complément (*Alternative Pathway*, AP50) se fait dans un contexte de recherche de déficit immunitaire : plus précisément dans un contexte d'infections à germes encapsulés surtout en cas de forme sévère (purpura fulminans). Il est principalement indiqué pour le diagnostic de déficit en properdine, qui est de transmission liée à l'X.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce dosage se fait en première intention pour le dépistage des anomalies de la voie alterne du complément, principalement les déficits en properdine. Il doit toujours être associé à un dosage du CH50 (cf. [Fiche 11.1](#)) et de C3, C4 (cf. [Fiche 11.3](#)). Tout résultat anormal doit être complété d'un dosage antigénique de la properdine (déficit en facteur D, rarissime). Tout déficit doit faire l'objet d'une étude familiale y compris génétique (cf. [Fiche 11.15](#)).

Il peut également être fait en seconde intention quand un CH50 est effondré pour identifier la voie du complément dans laquelle se trouve la protéine déficitaire :

- CH50 et AP50 effondrée : protéine de la voie finale commune ;
- CH50 effondré et AP50 normale : protéine de la voie classique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma EDTA/citrate/sérum. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques. Non interprétable en cas de blocage thérapeutique de la voie commune (anti-C5).
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Pour le sérum et l'EDTA : centrifugation à froid, aliquotage du sérum ou du plasma et conservation à $-80^{\circ}\text{C}$ avec transport en carboglace. Pour le citrate : conservation du sang total 48 heures à température ambiante ; conservation d'aliqotes de plasma à $-80^{\circ}\text{C}$ .
<b>Méthodologie générale du test</b>	Le dosage de l'AP50 apprécie en point final l'activité fonctionnelle globale de la voie alterne et de la voie finale commune du complément en mesurant la lyse d'érythrocytes de lapin en présence du plasma à tester. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à un pool de plasmas traité dans les mêmes conditions que l'échantillon. Des techniques ELISA sont également disponibles, dans lesquelles une activation de l'échantillon est effectuée <i>in vitro</i> avec un activateur spécifique de la voie alterne (LPS), suivie d'un dosage de la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui, pour les laboratoires spécialisés.
<b>Performances du test</b>	Le dosage de l'AP50 est peu spécifique et peu sensible. Une AP50 $> 10\%$ élimine un déficit homozygote en properdine et, de façon indirecte, celles de la voie finale commune. Les performances des dosages ELISA sont à évaluer.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Importance de l'étape préanalytique (risque d'activation <i>in vitro</i> donnant une AP50 faussement diminuée). L'AP50 est physiologiquement basse chez le très jeune enfant. Un déficit en protéines de la voie finale commune (C5 à C9) donne également une AP50 effondrée.

## Fiche 11.3

**Dosages antigéniques de C3, C4 et C1 inhibiteur (C1Inh)****Signification biologique du paramètre**

Ces dosages permettent de mesurer la concentration sérique ou plasmatique des protéines du complément C3, C4 et C1Inh.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Ces dosages se font dans des contextes cliniques très variés, à la recherche d'un déficit héréditaire de l'immunité innée dans un contexte d'infection à germes encapsulés, ou d'une maladie auto-immune, notamment pour le suivi d'une maladie à complexes immuns (lupus érythémateux systémique) — dans ce cas, il existe un syndrome de consommation du complément par la voie classique. Ces dosages sont aussi indiqués pour le dia-

gnostic et le suivi d'un angioedème par déficit en C1Inh ou pour le bilan de néphropathies liées à une dérégulation de la voie alterne (SHU atypique, glomérulopathies à C3). Les dosages de C3 et C4 font parfois partie du bilan d'un syndrome inflammatoire (cf. Fiche 12.1).

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Les dosages de C3 et C4 se font en première intention et conjointement avec le dosage du CH50 (cf. Fiche 11.1). Le dosage du C1Inh se fait en première intention dans un contexte de suspicion d'angioedème, et, en association avec le dosage fonctionnel du C1Inh, en deuxième intention en cas de dosage antigénique de C4 diminué.

<b>Nature du prélèvement</b>	Variable selon les laboratoires et les techniques utilisées : plasma EDTA ou citrate, sérum. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Pour le sérum et l'EDTA : centrifugation à froid, aliquotage du sérum ou du plasma et conservation à -80 °C avec transport en carboglace. Pour le citrate : conservation du sang total 48 heures à température ambiante ; conservation d'aliqotes de plasma à -80 °C.
<b>Principe méthodologique</b>	La néphélométrie et la turbidimétrie sont les techniques les plus utilisées pour mesurer la concentration des protéines C3, C4, C1Inh, par immunoprécipitation. Un complexe immun est formé lors de l'addition à l'échantillon à doser d'un anticorps polyclonal d'origine animale spécifique de la protéine isolée. La néphélométrie et la turbidimétrie consistent à mesurer l'intensité de la lumière respectivement diffractée ou transmise par ces complexes pour la relier à une concentration grâce à une gamme d'étalonnage. Il est également possible de mesurer ces concentrations en immunodiffusion radiale (IDR).
<b>Type de méthode</b>	Automatisée en néphélométrie ou turbidimétrie.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Oui.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Bonnes.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La présence d'une cryoglobulinémie peut induire un dosage de C4 faussement diminué dans les échantillons transmis dans la glace.

## Fiche 11.4

**Dosage antigénique d'une protéine soluble du complément****Signification biologique du paramètre**

Ce dosage permet de déterminer la concentration sérique ou plasmatique des protéines du complément solubles : C1q, C1Inh, C5, C6, C7, C8, C9, properdine, facteur B (FB), facteur H (FH), facteur I (FI), C4BP, MBL.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Ces dosages sont indiqués dans différents contextes cliniques :

- bilan étiologique d'un déficit immunitaire : plus précisément dans un contexte d'infection à germe encapsulé (C5, C6, C7, C8, C9, properdine, éventuellement MBL, FB, FH et FI) ou de maladie auto-immune (C1q);
- bilan étiologique et suivi d'un angioedème (C1Inh et éventuellement C1q);

- bilan étiologique d'un SHU atypique ou d'une glomérulopathie à C3 (FB, FH, FI);
- bilan étiologique d'une thrombose (C4BP).

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Les dosages de FH, FI, C1Inh se font en première intention sur la base des éléments cliniques énumérés ci-dessus. Les autres dosages se font en deuxième intention en fonction du contexte clinique. Ils doivent être associés à des dosages fonctionnels de dépistage (voie classique et/ou voie alterne) (cf. [Fiches 11.1](#) et [11.2](#)) et à des dosages de C3 et C4 (cf. [Fiche 11.3](#)) pour permettre une interprétation biologique.

Des dosages fonctionnels des protéines individuelles peuvent compléter l'exploration.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma sur EDTA ou citrate/sérum. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques. Non interprétable en cas de blocage thérapeutique de la voie commune (anti-C5).
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Pour le sérum et l'EDTA : centrifugation à froid, aliquotage du sérum ou du plasma et conservation à -80 °C avec transport en carboglace. Pour le citrate : conservation du sang total 48 heures à température ambiante; conservation d'aliquotes de plasma à -80 °C.
<b>Méthodologie générale du test</b>	Ces dosages se font par une technique ELISA de type sandwich avec un anticorps spécifique de capture adsorbé sur une microplaque et un anticorps de révélation. Une courbe étalon ou un point de calibration permettent de calculer la concentration. Des coffrets ELISA commerciaux existent pour certains dosages.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisée pour l'ELISA. Les dosages du FB, du C1Inh et du C1q peuvent également être faits par néphélémétrie.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	EEQ commercial pour le C1Inh, EEQ international annuel pour les laboratoires spécialisés pour certaines protéines.
<b>Performances du test</b>	La spécificité et la sensibilité des tests, y compris commerciaux, nécessitent encore d'être évalués.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	L'administration préalable de produits dérivés sanguins (surtout le plasma frais congelé) peut donner de faux résultats.

## Fiche 11.5

## Dosage des fragments d'activation du complément : C3a, C5a, Bb, Soluble C5b9

### Signification biologique du paramètre

Ce dosage permet de quantifier spécifiquement des composants générés lors d'une activation du complément. Leur présence témoigne d'une activation systémique du complément, mais leur absence ne l'élimine pas car ces fragments sont très labiles ou fixés sur leurs récepteurs *in vivo*. Une activation *in vitro* peut donner un résultat faussement positif.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le dosage d'un fragment d'activation du complément est indiqué dans différents contextes cliniques où on veut mesurer l'activation systémique du complément :

- maladie auto-immune à complexes immuns (lupus érythémateux systémique), choc septique, syndrome d'ischémie-reperfusion, maladie sérique ;

- défaut de régulation : SHU atypique, glomérulonéphrites ;
- efficacité d'un blocage de l'activation du complément, par exemple lors d'un traitement par anticorps monoclonal thérapeutique (anti-C5 : éculizumab).

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ces dosages se font en deuxième intention sur la base des éléments cliniques énumérés ci-dessus. Leur intérêt clinique reste à démontrer en pratique de routine. Leur indication est pour l'instant restreinte au cadre de protocoles de recherche clinique mais leur prescription est en cours d'évolution avec l'apparition de traitements ciblant spécifiquement le complément.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma sur EDTA ou citrate/sérum en fonction des laboratoires. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques. Préciser un éventuel blocage thérapeutique de la voie commune (anti-C5).
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Pour le sérum et l'EDTA : centrifugation à froid, aliquotage du sérum ou du plasma et conservation à -80 °C avec transport en carboglace. Pour le citrate : conservation du sang total 48 heures à température ambiante ; conservation d'aliquotes de plasma à -80 °C.
<b>Méthodologie générale du test</b>	Ces dosages se font par une technique ELISA de type sandwich avec un anticorps spécifique de capture adsorbé sur une microplaque et un anticorps de révélation. Une courbe étalon ou un point de calibration permettent de calculer la concentration. Des trousses ELISA commerciales existent.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable pour l'ELISA.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	La spécificité et la sensibilité des tests, y compris commerciaux, nécessitent encore d'être évalués.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Une activation <i>in vitro</i> rend les résultats faussement élevés.

## Fiche 11.6

**Dosages fonctionnels de C2 et de C4****Objectifs de l'analyse et principales indications**

Ces dosages mesurent la capacité fonctionnelle de la protéine C4 ou C2, composants de la voie classique du complément, à s'activer *in vitro*. Les dosages fonctionnels de C2 et C4 peuvent être indiqués pour explorer un dosage de CH50 abaissé ou effondré de façon répétitive et non expliquée, chez un patient dans un contexte de

maladies auto-immunes de type lupique ou d'infections à répétition.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ces dosages se font en seconde intention. Le dosage du CH50 (cf. [Fiche 11.1](#)) et la mesure de la concentration sérique ou plasmatique des protéines C3 et C4 (cf. [Fiche 11.3](#)) doivent être préalablement effectués avant ces analyses.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma EDTA/citrate/sérum. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques. Non interprétable en cas de blocage thérapeutique de la voie commune (anti-C5).
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Pour le sérum et l'EDTA : centrifugation à froid, aliquotage du sérum ou du plasma et conservation à $-80^{\circ}\text{C}$ avec transport en carboglace. Pour le citrate : conservation du sang total 48 heures à température ambiante ; conservation d'aliqotes de plasma à $-80^{\circ}\text{C}$ .
<b>Méthodologie générale du test</b>	Il s'agit de tests hémolytiques dans lesquels les protéines de la cascade d'activation de la voie classique et de la voie finale commune sont apportées en excès sous forme purifiée ou de sérum de cobaye, à l'exception du composant à tester. L'hémolyse mesurée est donc uniquement dépendante de la concentration et de la fonctionnalité de la protéine étudiée. Les résultats sont donnés en pourcentage d'un pool de plasmas donneurs sains. Pour caractériser un déficit d'expression pour ces deux protéines, il est nécessaire d'effectuer un dosage fonctionnel et pondéral (C2 par immunodiffusion radiale, C4 par néphélométrie).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Les intervalles des valeurs de référence et les performances sont propres à chaque laboratoire.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Importance de l'étape préanalytique (risque d'activation <i>in vitro</i> donnant des valeurs faussement diminuées). Interprétation difficile en cas de blocage thérapeutique (anti-C5) de la voie finale commune.

## Fiche 11.7

**Dosages fonctionnels du facteur H et du facteur I****Signification biologique du paramètre**

Le facteur H (FH) et le facteur I (FI) sont des protéines plasmatiques qui régulent négativement l'activation du système du complément. Le FH régule la formation de la C3 convertase alterne, C3bBb, en phase fluide et sur les surfaces cellulaires. Le FI inactive par protéolyse les protéines C3b et C4b, en C3bi et C4bi à l'aide de cofacteurs.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Les dosages fonctionnels du FH et du FI se font dans un contexte de suspicion de maladie liée à une dérégulation de la voie alterne du complément : infections à répétition avec dosage antigé-

nique du C3 diminué inexplicé, SHU atypique, glomérulopathies à C3.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Le test d'exploration de la capacité du FH à protéger les surfaces cellulaires se fait en première intention dans un contexte de SHU atypique. Les autres dosages se font en deuxième intention sur la base des éléments cliniques énumérés ci-dessus. Les dosages antigéniques des protéines C3, FB, FH, FI (cf. [Fiche 11.4](#)) et la recherche d'anticorps anti-facteur H (cf. [Fiche 11.9](#)) doivent être effectués préalablement à ces analyses. Ces dosages fonctionnels ne sont pas utiles en cas de déficit quantitatif.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma EDTA/citrate/sérum. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques. Non interprétable en cas de blocage thérapeutique de la voie commune (anti-C5).
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Pour le sérum et l'EDTA : centrifugation à froid, aliquotage du sérum ou du plasma et conservation à -80 °C avec transport en carboglace. Pour le citrate : conservation du sang total 48 heures à température ambiante ; conservation d'aliquotes de plasma à -80 °C.
<b>Méthodologie générale du test</b>	Ces trois tests font appel à des techniques utilisant des globules rouges de mouton (tests hémolytiques). Le dosage fonctionnel du FH explore sa capacité à dissocier une C3 convertase alterne préformée <i>in vitro</i> sur des globules rouges de mouton. Un autre test fonctionnel du facteur H explore plus spécifiquement la fonction de protection des surfaces cellulaires. Le dosage fonctionnel du facteur I explore sa fonction protéolytique du C3b.
<b>Type de méthode</b>	Manuelles.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Ces tests ne sont pas faits en première intention et inutiles en cas de déficit quantitatif. Ils sont sensibles et très spécifiques. Une anomalie de ces dosages est une indication à une exploration plus poussée avec études génétiques.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Des conditions préanalytiques correctes sont indispensables. Le test étudiant la protection cellulaire du FH ne peut pas être effectué avec des échantillons contenant des taux de C3 très diminué ou chez les sujets traités par un anticorps monoclonal thérapeutique bloquant le complément (anti-C5). Ces tests doivent être pratiqués par un personnel ayant une expertise dans les tests hémolytiques.

## Fiche 11.8

**Dosage fonctionnel de la Mannan Binding Lectin (MBL)****Signification biologique du paramètre**

La *Mannan Binding Lectin* (MBL) est une protéine soluble de la famille des lectines C capable de reconnaître des micro-organismes pathogènes par le code des oligosaccharides. Elle s'associe aux sérine protéases MASP-1 et MASP-2 pour développer des convertases dont la finalité est l'élimination du pathogène.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le déficit quantitatif ou qualitatif en MBL se traduit très tôt chez des enfants par des infections à

répétition (ORL majoritairement) en raison d'un défaut d'opsonisation et d'élimination des pathogènes (OMIM 614372).

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Le dosage fonctionnel de la MBL intervient en seconde intention pour le dépistage des anomalies qualitatives et quantitatives de MBL lorsqu'aucune anomalie fonctionnelle de la voie classique et de la voie alterne n'a été observée. La baisse de la fonction de la MBL est associée à des polymorphismes génétiques.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma sur citrate.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Recueil du plasma pauvre en plaquettes.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport à température ambiante ou réfrigéré.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du sang total 48 heures à température ambiante ; conservation d'aliquotes de plasma à -80 °C.
<b>Principe méthodologique</b>	Des mannanes fixés sur une plaque de microtitration activent le complément par la voie des lectines, entraînant une fixation de C4b. Celle-ci est révélée par un anticorps anti-C4 marqué à la peroxydase. La mesure de l'absorbance est directement proportionnelle à la fonction de MBL dans son engagement avec la protéase MASP-2. Des troussees commerciales qui mesurent la formation du complexe d'attaque membranaire sont disponibles.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonne.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Réservé à des laboratoires spécialisés.

## Fiche 11.9

## Recherche et quantification d'anticorps anti-protéines du complément

### Signification biologique du paramètre

Ces dosages recherchent et quantifient la présence d'autoanticorps dirigés contre les protéines du complément C1q, C1 inhibiteur (C1Inh) ou facteur H (FH).

### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche d'anticorps anti-protéines du complément est indiquée dans différents contextes cliniques :

- anti-C1q (surtout d'isotype IgG) au cours du lupus érythémateux systémique, des vascularites urticariantes et hypocomplémentémiantes (syndrome de Mac Duffy);
- anti-C1Inh (tous isotypes) dans les angioœdèmes acquis;
- anti-facteur H dans le SHU atypique (surtout d'isotype IgG) et les glomérulopathies à C3 (tous isotypes).

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ces dosages se font en première intention sur la base des éléments cliniques énumérés ci-dessus et doivent être associés à d'autres analyses (cf. [Fiches 11.1 à 11.3](#)) :

- anti-C1q : CH50, C3 et C4 antigéniques pour apprécier l'activation de la voie classique;
- anti-C1Inh : CH50, C3, C4, C1Inh antigénique et fonctionnel; en cas de positivité rechercher une gammopathie monoclonale;
- anti-facteur H : C3, C4, FB, FH, dépistage des déficits d'interaction du FH aux surfaces.

<b>Nature du prélèvement</b>	Variable selon les laboratoires (plasma EDTA ou citrate, sérum) et les techniques utilisées. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Pour le sérum et le plasma EDTA : conservation et transport du prélèvement à froid. Si délai, centrifugation à froid, aliquotage du plasma ou sérum et conservation à -80 °C avec transport en carboglace. Pour le plasma citrate : conservation et transport du prélèvement en sang total en 48 heures à température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation d'aliquotes à -80 °C.
<b>Principe méthodologique</b>	Ces dosages se font par des techniques ELISA utilisant la protéine purifiée cible déposée sur une microplaque et un anticorps anti-immunoglobuline de révélation. Une courbe étalon ou un point de calibration permettent de calculer la concentration. Pour certains anticorps, des trousses commerciales existent.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou automatisable pour l'ELISA.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui, pour les laboratoires spécialisés.
<b>Performances des tests</b>	La spécificité et la sensibilité des tests, y compris commerciaux, nécessitent encore d'être évalués.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Hypogammaglobulinémie, traitements pouvant influencer sur le titre des anticorps.

## Fiche 11.10

**C3 Nephritic factor (C3Nef, anticorps anti-C3 convertase alterne)****Signification biologique du paramètre**

Le C3 *Nephritic factor*, ou C3Nef, est un auto-anticorps anti-C3 convertase alterne (complexe C3bBb) qui stabilise l'activité enzymatique de ce complexe. Il induit par conséquent une activation continue pathologique de la voie alterne du complément et contribue à la formation de dépôts de C3, essentiellement au niveau glomérulaire rénal.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche de C3Nef se fait dans le contexte de :

- glomérulonéphrites membranoprolifératives avec ou sans dépôts denses ;

- glomérulonéphrites à dépôts isolés de C3 ;
- glomérulonéphrites aiguës post-infectieuses ;
- syndrome de Barraquer-Simons, ou lipodystrophie partielle.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce dosage se fait en première intention dans l'exploration des pathologies mentionnées ci-dessus. Le dosage de cet anticorps doit être accompagné de celui de C3, de C4, du facteur B et de l'activité de la voie classique du complément (CH50) (cf. [Fiches 11.1 à 11.4](#)). À noter que des concentrations normales des protéines C3 et facteur B n'éliminent pas la présence de cet autoanticorps.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma EDTA recommandé.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Conservation et transport du prélèvement à froid. Si délai, centrifugation à froid, aliquotage du plasma et conservation à – 80 °C avec transport en carboglace.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation d'aliquotes à – 80 °C.
<b>Principe méthodologique</b>	La technique de référence pour la recherche de C3Nef est une méthode hémolytique. Dans un premier temps, une C3 convertase alterne est préformée <i>in vitro</i> à la surface d'hématies de mouton à l'aide de protéines purifiées. En parallèle, les immunoglobulines du plasma du patient sont isolées. Le test évalue la stabilisation de la C3 convertase à la surface des hématies en présence de doses croissantes d'immunoglobulines semi-purifiées du patient à tester, en effectuant une mesure de la cinétique de l'hémolyse induite. On peut également utiliser une technique ELISA recherchant la fixation des IgG (C3Nef) sur une C3 convertase alterne adsorbée.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui, EEQ annuel international pour les laboratoires spécialisés.
<b>Performances du test</b>	Le test est très spécifique mais peu sensible : la recherche doit être répétée en cas de contexte clinique évocateur.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Nécessité d'un volume du prélèvement suffisant pour effectuer une purification performante des IgG. Ce test doit être pratiqué par un personnel ayant une expertise dans les tests hémolytiques.

## Fiche 11.11

**Exploration fonctionnelle du C1 inhibiteur (C1Inh)****Signification biologique du paramètre**

Le C1 inhibiteur (C1Inh) est une serpine plasmatique contrôlant l'activation et l'activité du complexe C1 du complément, de la phase contact et de la voie intrinsèque de la coagulation (facteur XI), de la fibrinolyse et plus généralement de la kininofomation. Plus de 400 mutations du gène *SERPING1* ont été décrites liées à une perte de fonction de C1Inh (formes congénitales d'œdème angioneurotique). Il existe également des anomalies acquises par hyperconsommation ou autoanticorps anti-C1Inh. Dans son interaction vis-à-vis des protéases cibles, C1Inh engage une liaison covalente stable, détectable par électrophorèse en milieu dénaturant, et subit une coupure protéolytique qui peut être importante pendant la crise d'angioœdème.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage (cf. [Fiche 11.3](#)) et l'exploration fonctionnelle de C1Inh font partie du bilan des angi-

œdèmes. Le dosage fonctionnel mesure l'activité inhibitrice de C1Inh sur un substrat. On peut évaluer en immunoblot l'abondance relative des espèces moléculaires liées aux coupures protéolytiques qui n'affectent pas l'allèle pathologique non fonctionnel. Cette observation qualifie l'angioœdème de type II avec expression des deux allèles.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce sont des tests de première intention pour le dépistage des déficits en C1Inh héréditaires ou acquis, en association avec le dosage protéique de C4 et de C1Inh. Tout déficit doit faire l'objet d'une étude familiale y compris génétique (cf. [Fiche 11.15](#)). Dans les conditions d'angioœdème héréditaire avec C1Inh normal, l'exploration des enzymes kininofomatrices (cf. [Fiche 11.12](#)) et du catabolisme des kinines peut être prescrite en seconde intention, après enquête clinique et concertation pluridisciplinaire.

<b>Nature du prélèvement</b>	Variable selon les laboratoires (plasma EDTA ou citrate, sérum) et les techniques utilisées. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Importance de la maîtrise des conditions préanalytiques.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Pour le sérum et le plasma EDTA : conservation et transport du prélèvement à froid ; en cas de délai, centrifugation à froid, aliquotage du plasma ou sérum et conservation à -80 °C avec transport en carboglace. Pour le plasma citrate : conservation et transport du prélèvement en sang total en 48 heures à température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation d'aliquotes à -80 °C.
<b>Principe méthodologique</b>	L'étude fonctionnelle du C1Inh plasmatique mesure sa capacité d'inactivation d'une protéase cible générant un produit de clivage coloré. L'étude de la fonction spécifique (U/mg) rend compte de la perte fonctionnelle (anomalie ou inactivation). L'étude en immunoblot est effectuée après incubation du plasma avec la protéase cible, électrophorèse (SDS-PAGE), transfert et révélation immunoenzymatique avec un anticorps polyclonal anti-C1Inh.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Sensibilité variable en fonction des trouses.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les dosages fonctionnels de C1Inh ne sont réalisés que dans quelques laboratoires spécialisés. Les conditions préanalytiques sont déterminantes pour la réalisation de l'immunoblot.

## Fiche 11.12

## Exploration de l'angioedème : systèmes des kininogénases

### Signification biologique des paramètres

Les périodes actives d'angioedème chez les patients ayant une fonction normale de C1 inhibiteur (C1Inh) sont associées à un mauvais contrôle de l'activité du système des kinines. Plusieurs éléments de ce système peuvent être explorés : activité kininogénase spontanée du plasma, capacité d'activation des proenzymes à kininogénase, activité plasmatique de l'aminopeptidase P, de la carboxypeptidase N, de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I et de la dipeptidylpeptidase IV et mise en évidence du clivage du kininogène de haut poids moléculaire en bradykinine.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Ces différents tests permettent le dépistage des situations de kininoformation exagérée soit de façon globale, soit en ciblant des enzymes spécifiques.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit de tests de deuxième intention, après enquête clinique et concertation pluridisciplinaire pour qualifier un angioedème avec fonction normale de C1Inh (cf. [Fiche 11.11](#)) associé à une activation de la phase contact kininofomatrice.

<b>Nature du prélèvement</b>	Plasma sur citrate.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Acheminement rapide. La prise de certains médicaments et le délai par rapport aux crises sont des éléments importants. Contacter le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport du sang total non centrifugé en moins de 48 heures à température ambiante. Sinon, aliquotage du plasma pauvre en plaquettes (PPP) et congélation à $-80^{\circ}\text{C}$ .
<b>Mode de conservation</b>	Analyse en moins de 48 heures ou congélation du PPP à $-80^{\circ}\text{C}$ .
<b>Principe méthodologique</b>	L'activité kininogénase spontanée mesure l'activité amidasique (Pro-Phe-Arg-pNA), celle de l'aminopeptidase P sur Lys(Dnp)-Pro-Pro-Gly-Lys(Abz) en présence d'enalaprilate, celle de la carboxypeptidase N est sur Dns-Ala-Arg, celle de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I sur Phe-Ala-Pro-Gly-Gly ou $[^3\text{H}]$ Hip-Gly-Gly, celle de la dipeptidylpeptidase IV sur L-Gly-Pro-p-nitro-naphthylamide. L'immunoblot du kininogène est révélé avec un anticorps anti-chaîne L et compare le signal d'un plasma témoin à celui du patient dans lequel ce précurseur de la bradykinine est clivé.
<b>Type méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitatives ou avec données quantifiables ( $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ).
<b>CIQ</b>	Substrats commerciaux, plasmas contrôles maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Variables selon les tests.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Importance de l'étape préanalytique par rapport à la crise et aux traitements. Examens réalisés dans des laboratoires spécialisés.

## Fiche 11.13

## Mesure de l'expression de la *Membrane Cofactor Protein* (MCP, ou CD46)

### Signification biologique du paramètre

La *Membrane Cofactor Protein* (MCP, ou CD46) est une protéine membranaire présente sur les cellules hématopoïétiques (sauf les globules rouges) ainsi que sur les cellules épithéliales et endothéliales. Elle a une fonction de régulation du complément en servant de cofacteur au facteur I pour la dégradation protéolytique de C4b (voie classique) et C3b (voies classique et alterne).

### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'étude de l'expression membranaire de CD46 permet le dépistage des déficits quantitatifs com-

plets ou partiels de cette protéine. Cette analyse est indiquée principalement dans un contexte de maladies rénales liées à une dérégulation du complément (SHU atypique, glomérulopathies à C3) ou peut être effectuée pour explorer une diminution du dosage antigénique de C3 ou dans un contexte d'infections à répétition avec C3 bas.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce dosage se fait en première intention pour l'exploration d'un SHU atypique ou de glomérulopathies à C3, en seconde intention dans les autres cas.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un seul tube de sang total sur EDTA. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Conservation et transport du prélèvement à température ambiante (< 48 heures).
<b>Mode de conservation</b>	Pas de conservation possible en post-analytique.
<b>Méthodologie générale du test</b>	Ce dosage se fait en cytométrie en flux, par une technique sur sang total après marquage avec un anticorps monoclonal anti-CD46 couplé à un fluorochrome et lyse des globules rouges. L'expression membranaire est quantifiée par la mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) sur la population de granuleux éventuellement repérés par un marquage spécifique complémentaire.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonnes. Une diminution d'expression est néanmoins toujours contrôlée sur un deuxième échantillon.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Résultats ininterprétables en cas de prélèvement coagulé.

## Fiche 11.14

## Recherche d'une hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)

### Signification biologique du paramètre

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), ou syndrome de Marchiafava-Michelli, est une maladie clonale de la cellule souche hématopoïétique dans laquelle le gène *PIG-A* codant le groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) est invalidé par une mutation somatique. En conséquence, les protéines normalement ancrées à la surface membranaire par ce groupement ne sont plus exprimées. Parmi elles figurent les protéines CD55 (ou DAF, *Decay Accelerating Factor*) et CD59 (ou protectine), qui sont des protéines de régulation du complément agissant respectivement au niveau des C3 convertases et de la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM). L'absence d'expression de ces deux protéines à la surface des globules rouges et des plaquettes est responsable d'une augmentation de sensibilité de ceux-ci à la lyse du complément. Les patients atteints présentent une hémolyse chronique avec des épisodes aigus, des

thromboses de gravité et de localisations inhabituelles et un risque de leucémisation.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche d'HPN a pour objectif de mettre en évidence une population de cellules sanguines (globules rouges et/ou granuleux et/ou monocytes) présentant une expression de protéines ancrées (CD55, CD59, CD14, CD16, CD24...), diminuée (clone de type II) ou absente (clone de type III ou clone HPN).

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce test se fait en première intention quand il y a suspicion d'HPN. Il permet également le suivi de cette maladie en déterminant le pourcentage de cellules négatives.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang total sur EDTA. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Conservation et transport rapide à température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Pas de conservation possible en post-analytique.
<b>Méthodologie générale du test</b>	Ce dosage se fait en cytométrie en flux, par une technique sur sang total réalisée sans et avec lyse des globules rouges et marquage avec des anticorps monoclonaux dirigés contre au moins deux protéines ancrées (anti-CD55, CD59, CD14, CD16, CD24, selon les laboratoires) couplés à des fluorochromes. L'expression membranaire est quantifiée par la mesure de la moyenne d'intensité de fluorescence (MF) sur les globules rouges, la population de granuleux éventuellement repérés par un marquage spécifique complémentaire et/ou la population monocyttaire. Il est également possible d'utiliser une molécule d'origine bactérienne (FLAER) qui se fixe spécifiquement aux liaisons GPI. L'absence de marquage FLAER signe l'anomalie recherchée.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative avec données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Test sensible et spécifique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les résultats sur les globules rouges peuvent être faussés par une administration de culot globulaire préalable. Le traitement par anti-C5, en protégeant les globules rouges de la lyse, augmente le pourcentage de cellules déficitaires observées.

## Fiche 11.15

**Exploration génétique du complément****Signification biologique du paramètre**

L'exploration génétique du complément permet d'identifier des anomalies ou des polymorphismes génétiques de gènes codant pour des protéines du complément.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Ces explorations sont effectuées par des techniques de biologie moléculaire dans différentes situations. Elles permettent de caractériser une anomalie génétique à l'origine d'un déficit quantitatif ou fonctionnel d'une protéine du complément (exemples les plus fréquents : déficit en C2 ou en l'une des protéines de la voie finale commune C5 à C9). On les utilise également pour étudier des polymorphismes génétiques identifiés comme

étant associés à des situations pathologiques données, par exemple le SHU atypique, les glomérulopathies à C3 associés tous deux au polymorphisme des gènes codant le facteur H (FH) ou pour CD46.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Cette exploration se fait en deuxième intention, dans tous les cas après une exploration protéique. Souvent une perturbation de celle-ci est à l'origine de l'indication d'une étude génétique. Néanmoins, dans certaines situations, une exploration protéique normale n'élimine pas la présence d'une mutation délétère de gènes codant les protéines de la voie alterne du complément (FH, FI, CD46 C3, FB), comme dans le SHU atypique ou les glomérulopathies à C3.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang total sur EDTA. Se renseigner auprès du laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Toute demande doit se faire dans un contexte clinico-biologique bien déterminé et s'accompagner d'un consentement pour étude génétique après information donnée au patient.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Conservation et transport du prélèvement à température ambiante (maximum 48 heures).
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à froid de l'ADN extrait.
<b>Principe méthodologique</b>	Cette exploration utilise différentes techniques de biologie moléculaire : simple PCR, séquençage exonique, MLPA ( <i>Multiplex Ligand Probe Amplification</i> ), séquençage d'ADN.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Ces explorations doivent être effectuées par des laboratoires ayant l'agrément pour réaliser des études génétiques, avec une compétence reconnue sur les pathologies liées au complément. Les performances sont bonnes. Une anomalie identifiée est toujours contrôlée sur un deuxième échantillon et peut faire l'objet d'une étude familiale de dépistage si une thérapie préventive peut être proposée (par exemple, vaccination anti-méningocoque en cas de déficits en protéines de la voie finale commune ou en properdine).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La pathogénicité des mutations identifiées n'est pas toujours établie.

## Bibliographie du chapitre 11

FICHE 11.1 – Dosage fonctionnel de la voie classique du complément

Frémeaux-Bacchi V, et al. Exploration du complément : actualités 2012. RFL 2012; 444 : 31–7.

Kazatchkine M, et al. Techniques du complément. Paris : INSERM; 1985.

Picard C. Comment explorer un déficit immunitaire héréditaire? Rev Prat 2007; 15 : 1671–6.

FICHE 11.2 – Dosage fonctionnel de la voie alterne du complément

Frémeaux-Bacchi V, et al. Exploration du complément : actualités 2012. RFL 2012; 444 : 31–7.

Kazatchkine M, et al. Techniques du complément. Paris : INSERM; 1985.

Picard C. Comment explorer un déficit immunitaire héréditaire? Rev Prat 2007; 15 : 1671–6.

FICHE 11.3 – Dosages antigéniques de C3, C4 et C1 Inhibiteur (C1Inh)

Frémeaux-Bacchi V, et al. Exploration du complément : actualités 2012. RFL 2012; 444 : 31–7.

Picard C. Comment explorer un déficit immunitaire héréditaire? Rev Prat 2007; 15 : 1671–6.

FICHE 11.4 – Dosage antigénique d'une protéine soluble du complément

Chatenoud L, Bach J-F. Immunologie. 6<sup>e</sup> éd. Paris : Lavoisier; 2012.

Frémeaux-Bacchi V, et al. Exploration du complément : actualités 2012. RFL 2012; 444 : 31–7.

FICHE 11.5 – Dosage des fragments d'activation du complément : C3a, C5a, Bb, Soluble C5b9

Antti P, et al. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion : role of the terminal complement components and inhibition by anti C5 therapy. Circulation 1998; 97 : 2259–67.

Guo RF, et al. Role of C5a in inflammatory responses. Annu Rev Immunol 2005; 23 : 821–52.

Mollnes TE, et al. Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation : consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. Clin Exp Immunol 1988; 73 : 484–8.

FICHE 11.6 – Dosages fonctionnels de C2 et de C4

Dragon-Durey MA, et al. Lack of evidence of a specific role for C4A gene deficiency in determining disease susceptibility among C4-deficient patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Clin Exp Immunol 2001; 123 : 133–9.

Frémeaux-Bacchi V, et al. Exploration du complément : actualités 2012. RFL 2012; 444 : 31–7.

Kazatchkine M, et al. Techniques du complément. Paris : INSERM; 1985.

FICHE 11.7 – Dosages fonctionnels du facteur H et du facteur I

Kazatchkine MD, et al. Human alternative complement pathway membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. J Immunol 1979; 122 : 75–81.

Roumenina LT, et al. Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. J Immunol Methods 2011; 365 : 8–26.

Sánchez-Corral P, et al. Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. Mol Immunol 2004; 41 : 81–4.

FICHE 11.8 – Dosage fonctionnel de la *Mannan Binding Lectin* (MBL)

Ali YM, et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. PLoS Pathog 2012; 8 : e1002793.

Dumestre-Pérard C, et al. Evaluation and clinical interest of mannan binding lectin function in human plasma. Mol Immunol 2002; 39 : 465–73.

Thiel S, et al. Humoral pattern recognition molecules : mannan-binding lectin and ficolins. Adv Exp Med Biol 2009; 653 : 58–73.

FICHE 11.9 – Recherche et quantification d'anticorps anti-protéine du complément

Cicardi M, et al. The acquired deficiency of C1-inhibitor : lymphoproliferation and angioedema. Curr Mol Med 2010; 10 : 354–60.

Dragon-Durey MA, et al. Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. J Am Soc Nephrol 2005; 16 : 555–63.

Yin Y, et al. Diagnostic value of serum anti-C1q antibodies in patients with lupus nephritis : a meta-analysis. Lupus 2012; 21 : 1088–97.

FICHE 11.10 – C3 *Nephritic factor* (C3Nef)

Kazatchkine M, et al. Techniques du complément. Paris : INSERM; 1985.

Paixão-Cavalcante D, et al. Sensitive and specific assays for C3 nephritic factors clarify mechanisms underlying complement dysregulation. Kidney Int 2012; 82 : 1084–92.

FICHE 11.11 – Exploration fonctionnelle du C1 inhibiteur (C1Inh)

Drouet C, et al. A sensitive method to assay blood complement C1 Inhibitor activity. Clin Chim Acta 1988; 174 : 121–30.

Thelwell C, et al. An international collaborative study to establish the WHO 1st international standards for C1-inhibitor, plasma and concentrate. J Thromb Haemost 2011; 9 : 2097–9.

Wagenaar-Bos I, et al. Functional C1-Inhibitor diagnostics in hereditary angioedema : assay evaluation and recommendations. *J Immunol Methods* 2008 ; 338 : 14–20.

FICHE 11.12 – Exploration de l'angioedème : systèmes des kininogénases

Byrd JB, et al. Dipeptidyl peptidase IV in angiotensin-converting enzyme inhibitor associated angioedema. *Hypertension* 2008 ; 51 : 141–7.

Cilia La Corte AL, et al. A functional XPNPEP2 promoter haplotype leads to reduced plasma aminopeptidase P and increased risk of ACE inhibitor-induced angioedema. *Hum Mutat* 2011 ; 32 : 1326–31.

Defendi F, et al. Enzymatic assays for the diagnosis of BK-dependent angioedema. *PLoS ONE* 2013 ; 8 : e70140.

FICHE 11.13 – Mesure de l'expression de la *Membrane Cofactor Protein* (MCP, ou CD46)

Frémeaux-Bacchi V, et al. Exploration du complément : actualités 2012. *RFL* 2012 ; 444 : 31–7.

Noris M, et al. Atypical hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 2009 ; 22 : 1676–87.

FICHE 11.14 – Recherche d'une hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)

Borowitz M, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry Part B* 2010 ; 78 : 211–30.

Jeffrey J, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from Bench to Bedside. *Clin Transl Sci* 2011 ; 4 : 219–24.

Peffault de Latour R, et al. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Rev Prat* 2007 ; 57 : 701–3.

FICHE 11.15 – Exploration génétique du complément

Frémeaux-Bacchi V, et al. Exploration du complément : actualités 2012. *RFL* 2012 ; 444 : 31–7.

Noris M, et al. Atypical hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 1676–87.

# Chapitre 12

## **Bilan d'un processus inflammatoire**

## Synopsis XVII

## Exploration d'un processus inflammatoire

## Hémogramme perturbé

Anémie, hyperleucocytose

## Vitesse de sédimentation

*VS > 30 mm  
à 1 heure***Attention :**

- fausse accélération : anémie sévère, hypercholestérolémie, hypergammaglobulinémie, grossesse, sujet âgé, traitement par héparine
- accélération masquée : polyglobulie, hyperleucocytose, hypofibrinogénémie

Électrophorèse  
des protéines sériques

Augmentation des fractions  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$   
Hypergammaglobulinémie polyclonale ou monoclonale

Dosage  
des protéines sériques  
de l'inflammation (PRI)**PRI à amplitude de variation élevée :**

- CRP, procalcitonine, SAA : jusqu'à 1 000 fois la normale
- Cinétique rapide (6 h) et demi-vie courte (1 jour)
- Processus inflammatoire débutant

**PRI à amplitude de variation modérée :**

- Fibrinogène, orosomucoïde, haptoglobine : de 200 à 400 fois la normale
- Cinétique 12 à 14 h et demi-vie 2 à 6 jours
- Recherche et suivi d'un processus inflammatoire

**PRI à amplitude de variation faible :**

- Céruloplasmine, fraction C3 du complément : 2 fois la normale
- Cinétique d'apparition > 48 h et demi-vie de 3 à 6 jours
- Indication : recherche et suivi d'un processus inflammatoire

**PRI à amplitude de variation négative :**

- Albumine, préalbumine et transferrine
- Au cours des syndromes inflammatoires prolongés, on peut voir une hypoalbuminémie inférieure à 30 g/L

## Fiche 12.1

### Dosage des protéines de la phase aiguë de l'inflammation

#### Signification biologique du paramètre

Les protéines de la réaction inflammatoire (PRI) sont des glycoprotéines synthétisées essentiellement par le foie sous la dépendance de cytokines pro-inflammatoires. Ce sont donc des marqueurs sériques dont la concentration plasmatique varie (PRI à amplitude de variation positive ou négative) en réponse à tout processus inflammatoire, quelle qu'en soit l'origine : infectieuse, tumorale, auto-immune, traumatique.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La protéine de l'inflammation idéale pour le diagnostic biologique devrait obéir à cinq critères :

- variation uniquement dépendante de la réaction inflammatoire (peu ou pas d'influence des traitements) ;
- variation indépendante de l'étiologie de l'inflammation et des dysfonctions d'organes ;
- variation significative ( $\pm 25\%$ ) par rapport à sa concentration basale même pour une inflammation modérée ;
- cinétique d'évolution rapide avec demi-vie courte ;
- dosage simple, rapide et peu coûteux

Aucune protéine ne remplissant toutes ces conditions, le recours au dosage combiné de plusieurs d'entre elles ayant des caractéristiques complémentaires est conseillé. Quatre groupes de protéines de la réponse inflammatoire peuvent être individualisés en fonction de leurs propriétés.

#### PRI à amplitude de variation élevée

Elles peuvent avoir des taux sériques jusqu'à 1 000 fois la normale dans un délai rapide (6 à 12 heures) et leur demi-vie est courte (1 jour). Parmi ces PRI, on peut classer la protéine C-réactive (CRP), la procalcitonine (PCT) et la protéine sérique amyloïde A (SAA). Le dosage de la CRP est justifié pour la recherche et le suivi d'un processus inflammatoire aigu débutant ; elle est élevée dans les infections microbiennes (sauf virales)

et dans les maladies inflammatoires non infectieuses. Le dosage de la PCT est indiqué lors de suspicions d'infections bactériennes, parasitaires ou fongiques profondes ; en revanche, la concentration en PCT n'est pas augmentée au cours des infections virales ou des pathologies inflammatoires non infectieuses.

#### PRI à amplitude de variation plus modérée

Elles ont des taux sériques de 200 à 400 fois la normale dans un délai plus long (12 heures) et ont une demi-vie plus longue (2 à 6 jours). Parmi ces PRI, on peut classer les anti-protéases ( $\alpha_1$ -antitrypsine,  $\alpha_1$ -antichymotrypsine), l'orosomucoïde, l'haptoglobine, le fibrinogène. Ces protéines sont de bons marqueurs de la phase chronique de l'inflammation.

#### PRI à amplitude de variation plus faible

Elles ont des taux sériques de 0,5 fois la normale, un délai de réponse plus long (> 48 heures) et une demi-vie longue (3 à 5 jours). On y trouve la céruéloplasmine ou la fraction C3 du complément.

#### PRI à amplitude de variation négative

Ce sont l'albumine, la préalbumine et la transferrine. Au cours des syndromes inflammatoires prolongés, on peut voir une hypoalbuminémie inférieure à 30 g/L. Un syndrome inflammatoire avec hypoalbuminémie n'est pas donc pas toujours le témoin d'un syndrome néphrotique ou d'une entéropathie exsudative.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il est judicieux d'associer le dosage de plusieurs protéines aux autres explorations d'un syndrome inflammatoire que sont l'hémogramme, la vitesse de sédimentation (de moins en moins utilisée) et, le cas échéant, l'électrophorèse des protéines sériques (cf. Fiche 9.1). En particulier, on associe deux protéines de demi-vie différente. La CRP, qui a une demi-vie courte et une large amplitude

de variation, comme la CPT, constitue le modèle des marqueurs de la phase aiguë de l'inflammation. Elle est présente à la concentration de quelques mg/L à l'état normal; elle peut s'élever jusqu'à 300–400 mg/L lors de processus inflammatoires aigus. Parmi les protéines de demi-vie

plus longue, le fibrinogène, l'haptoglobine ou l'orosomucoïde sont de bons marqueurs de la phase chronique de l'inflammation. Ce type de protéine est aussi très utile pour suivre des patients ambulatoires pour lesquels des prélèvements sont effectués moins fréquemment.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum. Le dosage sur plasma est possible. Le dosage dans les urines n'est pas recommandé.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Transport au laboratoire en moins de 24 heures à température ambiante.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Une semaine réfrigéré, ou congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	Dosages néphélométriques ou turbidimétriques.
<b>Type de méthode</b>	Automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Pour interpréter les PRI dans le contexte d'un syndrome inflammatoire, il faut juger de l'élévation des taux mesurés en fonction de la PRI dosée et du stade d'évolution du processus inflammatoire. Dans ce contexte, on note en parallèle l'abaissement du taux d'autres protéines plasmatiques, telles que l'albumine ou la transferrine.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	L'interprétation des résultats peut être compliquée par le fait que les taux de certaines PRI ne sont pas augmentés en cas de syndrome inflammatoire associé à une autre pathologie utilisant une de ces protéines. Ainsi l'haptoglobine est abaissée en cas d'hémolyse et le fibrinogène en cas de CIVD. Les fractions du complément peuvent être consommées en cas de maladies à complexes immuns comme dans le lupus érythémateux systémique. Enfin, la CRP n'est pas augmentée en cas d'infection virale ni, le plus souvent, au cours du lupus ou des rectocolites hémorragiques (dissociation VS/CRP).

## Fiche 12.2

**Dosage d'une cytokine ou d'un récepteur de cytokine****Signification biologique du paramètre**

Les cytokines sont des petites glycoprotéines solubles synthétisées par des cellules du système immunitaire ou d'autres cellules. Elles agissent dans leur environnement immédiat ou à distance par l'intermédiaire de récepteurs exprimés sur diverses cellules ou sur la cellule productrice elle-même. Ces récepteurs peuvent être produits sous forme soluble et participent à la régulation des réponses. Les cytokines et leurs récepteurs sont principalement impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire, l'inflammation et l'hématopoïèse.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Les dosages de cytokines ou de leurs récepteurs dans les milieux biologiques (sang, LCR, épanchement séreux, etc.) peuvent aider à l'orientation diagnostique des processus inflammatoires infectieux, auto-

immuns ou néoplasiques. Ils peuvent aussi être réalisés *in vitro* dans le milieu de culture après activation cellulaire. Ces dernières méthodes se développent de plus en plus dans le cadre du diagnostic d'infection lorsque les sérologies sont peu contributives ou pour repérer un déficit sélectif chez des patients immunodéficients et exposés à un pathogène. Enfin, des dosages de cytokines dans le cadre de l'initiation ou de la surveillance des biothérapies et de la vaccinologie sont en développement.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ces dosages sont des analyses pour la plupart en développement et réservés à des protocoles de recherche. Dans certaines situations particulières, le dosage de l'IL-6, des interférons non immuns, du TNF et de l'IL-10 dans les milieux biologiques peut être indiqué.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum, plasma ou liquide biologique. Sang prélevé sur anticoagulant (pour les tests de stimulation). Contacter le laboratoire exécutant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Si l'analyse n'est pas faite immédiatement, une conservation de l'échantillon à – 80 °C est impérative.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Transport rapide à température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à – 80 °C des échantillons jusqu'à l'analyse.
<b>Principe méthodologique</b>	Deux types de méthodes sont disponibles, ELISA sandwich et fluorimétrie sur billes multiplex. L'approche multiplex a pour avantage d'évaluer une réponse immunitaire complexe dans sa globalité sur un petit volume d'échantillon. Dans l'approche multiplex, des anticorps spécifiques de différentes cytokines ou récepteurs sont fixés à la surface de billes se distinguant par leur fluorescence intrinsèque (une spécificité d'anticorps par type de bille). Le liquide biologique ou le surnageant à tester est incubé avec les billes auxquelles sont rajoutés secondairement d'autres anticorps spécifiques de cytokines ou de récepteurs couplés à un fluorochrome. Cette préparation est analysée à l'aide d'un cytomètre en flux classique ou un cytomètre modifié (type Luminex®) capable de distinguer d'une part la fluorescence individuelle des billes et d'autre part les billes positives (capture de cytokine) ou négatives.
<b>Type de méthode</b>	Méthode automatisée ou semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Variable selon les techniques et les trousseaux.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Mauvaise conservation des échantillons, éviter les étapes de congélation/décongélation.

## Bibliographie du chapitre 12

FICHE 12.1 – Dosage des protéines  
de la phase aiguë de l'inflammation

Gabay C, et al. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340 : 448–54.

Van Rossum AM, et al. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Infect Dis* 2004; 4 : 620–30.

FICHE 12.2 – Dosage d'une cytokine  
ou d'un récepteur de cytokine

Dossus L, et al. Validity of multiplex-based assays for cytokine measurement in serum and plasma from non diseased (subjects) : comparison with ELISA. *J Immunol Methods* 2009; 350 : 125–32.

Kawamura H, et al. Interleukin-10 and interleukin 6 in aqueous humor during treatment of vitre or retinal lymphoma with intravitreally injected methotrexate. *Opht Res* 2009; 42 : 172–4.

# Chapitre 13

## **Immunophénotypes lymphocytaires**

## Fiche 13.1

### Numération des lymphocytes T CD4 et CD8

#### Signification biologique du paramètre

Les sous-populations lymphocytaires T sanguines, qui comportent les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8, peuvent être identifiées à l'aide des antigènes de différenciation CD qu'elles expriment à leur surface. Leurs proportions et leurs valeurs absolues évoluent avec l'âge. Des modifications particulières sont associées à divers contextes pathologiques.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'immunophénotypage des deux sous-populations principales de lymphocytes T périphériques, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, est un examen courant permettant de déterminer à la fois leurs proportions relatives au sein des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> et leur nombre absolu dans l'échantillon. Le ratio CD4/CD8 est également calculé. Il concerne les

patients chez qui est suspecté un déficit primitif ou acquis de l'immunité cellulaire T, tout particulièrement les patients VIH<sup>+</sup> et leur suivi lorsque le diagnostic est posé. Cet examen est également utile pour apprécier en première ligne l'immunité lymphocytaire T, quel que soit le contexte (maladies auto-immunes, infections sévères...).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'un examen de première intention pour le diagnostic de déficit immunitaire. Il est également utile pour le suivi pour les patients présentant un déficit immunitaire avéré. Cet examen est répété à 3 mois d'intervalle si une lymphopénie T (à interpréter en fonction de l'âge) est diagnostiquée pour la première fois. Dans le cadre du suivi de patients infectés par le VIH et traités, cet examen est prescrit tous les 3 à 6 mois en fonction de la stabilité clinique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un seul tube de 1 à 5 mL de sang prélevé de préférence sur EDTA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le volume d'anticoagulant ne doit pas entraîner de dilution de l'échantillon.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon en moins de 24 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	La numération des lymphocytes T CD4 et CD8 repose sur la réalisation d'un quadruple marquage CD45/CD3/CD4/CD8 suivi d'une mesure en cytométrie en flux. Le marquage est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents sur sang total suivi d'une lyse des globules rouges sans lavage. La population lymphocytaire est sélectionnée sur le cytomètre en flux selon des critères morphologiques (cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD45 (panleucocytes)/structure) et corrélée à l'évaluation des cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD3 (pan-T) et à celle des cellules marquées positivement par les anticorps anti-CD4 et/ou anti-CD8 coexprimant CD3. Les valeurs absolues, exprimées en nombre de cellules par mm <sup>3</sup> , sont déterminées en simple plateforme à l'aide d'un étalon interne constitué d'un volume de billes fluorescentes de concentration connue équivalent au volume de l'échantillon sanguin ajoutées dans le tube de préparation. Il est également possible de réaliser une mesure en double plateforme en calculant les valeurs absolues de chaque sous-population à l'aide du nombre absolu de lymphocytes déterminé en parallèle par un automate de numération, idéalement sur le même échantillon. Indépendamment de la mesure des cellules coexprimant CD3 et CD4 ou CD8, il est important de prêter attention à la présence éventuelle de cellules double positives ou double négatives pour ces deux antigènes.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée : préparateur de marquages, automate de lyse.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative. Interprétation en fonction de normes réalisées dans le laboratoire sur des sujets sains de différentes tranches d'âge ou publiées dans la littérature.
<b>CIQ</b>	Contrôles du constructeur pour le cytomètre, contrôles cellulaires commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Méthode sensible et spécifique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Dans le cas de l'utilisation de billes étalon pour déterminer les valeurs absolues, il est impératif de pipetter de façon identique les billes et le sang, ces deux échantillons devant être analysés volume à volume. La présence de microcaillots peut être à l'origine de différences entre les résultats mesurés en simple ou double plateforme. Du fait de l'existence de différences quantitatives pour un même échantillon entre les différentes techniques ou automates pour la détermination des valeurs absolues, il est recommandé qu'un patient soit toujours suivi pour ce test dans le même laboratoire.

## Fiche 13.2

### **Immunophénotypage des principales populations lymphocytaires circulantes (T, B, NK)**

#### **Signification biologique du paramètre**

Les sous-populations lymphocytaires sanguines, qui comportent les lymphocytes T, les lymphocytes B et les lymphocytes NK peuvent être identifiées à l'aide des antigènes de différenciation CD qu'elles expriment à leur surface. Leurs proportions et leurs valeurs absolues évoluent avec l'âge. Des modifications particulières sont associées à divers contextes pathologiques.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

L'immunophénotypage des populations lymphocytaires circulantes T, B, NK est un examen courant permettant de déterminer à la fois leurs proportions relatives au sein des lymphocytes et leur nombre

absolu dans un échantillon sanguin. Cet examen concerne les patients chez qui est suspecté un déficit primitif ou acquis de l'immunité. Cet examen est également utile pour apprécier l'immunité lymphocytaire, quel que soit le contexte (maladies auto-immunes, infection sévère...).

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Il s'agit d'un examen de première intention pour le diagnostic d'un déficit immunitaire sévère. Il est également utilisé pour le suivi de ces patients. Cet examen est complété par un immunophénotypage plus détaillé des lymphocytes si une lymphopénie ou une hyperlymphocytose est identifiée pour l'une ou plusieurs des sous-populations lymphocytaires.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un seul tube de 1 à 5 mL de sang prélevé de préférence sur EDTA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le volume d'anticoagulant ne doit pas entraîner de dilution de l'échantillon.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon en moins de 24 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>L'immunophénotypage des populations lymphocytaires circulantes T, B, NK repose le plus souvent sur la réalisation d'un quadruple marquage CD45/CD3/CD16-CD56 ou CD56 seul/CD19 suivi d'une mesure en cytométrie en flux. Le marquage est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents sur sang total suivi d'une lyse des globules rouges sans lavage. La population lymphocytaire est sélectionnée sur le cytomètre en flux selon des critères morphologiques (cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD45 (panleucocytes)/structure) et corrélée à l'évaluation des cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD3 (lymphocytes T) ou par l'anticorps anti-CD19 (lymphocytes B). Les cellules NK sont repérées par l'absence d'expression de CD3 et de CD19 et la positivité du marquage par les anticorps CD16 et/ou CD56. Il existe également un contingent de cellules NKT qui coexpriment ces marqueurs et CD3.</p> <p>Les valeurs absolues, exprimées en nombre de cellules par mm<sup>3</sup>, sont déterminées en simple plateforme à l'aide d'un étalon interne constitué d'un volume de billes fluorescentes, de concentration connue, équivalent au volume de l'échantillon sanguin, ajoutées dans le tube de préparation. Il est également possible de réaliser une mesure en double plateforme en calculant les valeurs absolues de chaque sous-population à l'aide du nombre absolu de lymphocytes déterminé par un automate de numération en parallèle, idéalement sur le même échantillon.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée : préparateur de marquages, automate de lyse.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative. Interprétation en fonction de normes réalisées dans le laboratoire sur des sujets sains de différentes tranches d'âge ou publiées dans la littérature.
<b>CIQ</b>	Contrôles du constructeur pour le cytomètre, contrôles cellulaires commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Méthode sensible et spécifique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>Dans le cas de l'utilisation de billes étalon pour déterminer les valeurs absolues, il est impératif de pipetter de façon précise les billes et le sang, ces deux échantillons devant être analysés volume à volume. La présence de microcaillots peut être à l'origine de différences entre les résultats mesurés en simple ou double plateforme.</p> <p>Du fait de l'existence de différences quantitatives pour un même échantillon entre les différentes techniques de mesure de la valeur absolue, il est recommandé qu'un patient soit toujours suivi pour ce test dans le même laboratoire.</p>

## Fiche 13.3

### **Immunophénotypage des principales populations lymphocytaires (T, B, NK) dans le liquide de LBA**

#### Signification biologique du paramètre

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) réalisé pendant la bronchoscopie permet une exploration du poumon distal avec le recueil d'un matériel cellulaire présent dans l'alvéole. L'analyse de la composition cellulaire de ce liquide peut être déterminée à l'aide des antigènes de différenciation CD que ces cellules expriment à leur surface.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'immunophénotypage du LBA permet de déterminer les proportions des principales populations lymphocytaires. Il permet aussi éventuellement d'examiner les caractéristiques des macrophages

alvéolaires, des polynucléaires et d'autres éléments cellulaires contenus dans l'échantillon. Cette analyse est contributive comme apport diagnostique dans de nombreuses affections pulmonaires associées à une alvéolite lymphocytaire T, principalement sarcoïdose, pneumopathie d'hypersensibilité, pneumopathie lymphocytaire du patient infecté par le VIH...

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'un examen de deuxième intention réalisé devant des signes cliniques ou radiologiques évocateurs d'une pathologie pouvant être associée à une alvéolite lymphocytaire dans un contexte de bilan étiologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	10 à 50 mL de liquide de lavage bronchoalvéolaire prélevé sous fibroscopie bronchique.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée ou réfrigéré si délai supérieur à 2 heures.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée si < 1 heure, réfrigérée si > 1 heure pour assurer un délai maximal de traitement d'une demi-journée.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>L'immunophénotypage des populations lymphocytaires T, B et NK repose sur la réalisation d'un multimarquage en un ou plusieurs tubes incluant CD45, des marqueurs T (CD3, CD4, CD8), NK (CD16-CD56 ou CD56 seul) et éventuellement B (CD19), suivi d'une mesure en cytométrie en flux. Le marquage est réalisé si nécessaire après centrifugation pour concentrer l'échantillon. Il est effectué à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents sur le liquide bronchoalvéolaire filtré suivi si nécessaire d'une lyse des globules rouges sans lavage.</p> <p>La population lymphocytaire est sélectionnée sur le cytomètre en flux selon des critères morphologiques (cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD45 (panleucocytes)/ structure) et corrélée à l'évaluation des cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD3 (pan-T), par les anticorps anti-CD4 et/ou anti-CD8 coexprimant CD3 (lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> respectivement) et par l'anticorps anti-CD19 (lymphocytes B). Les cellules NK sont repérées par l'absence d'expression de CD3 et CD19 et l'expression de CD16 et/ou CD56.</p> <p>Un marquage complémentaire CD11b/HLA-DR peut être ajouté pour identifier les macrophages et les quantifier.</p> <p>La recherche de l'expression de CD103 est utile pour le diagnostic de sarcoïdose.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Méthode sensible et spécifique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>Il faut tenir compte du caractère potentiellement hémorragique du prélèvement et étudier éventuellement en parallèle le sang périphérique du patient.</p> <p>Les immunophénotypages nécessitent des compétences spécifiques techniques et d'interprétation. Il existe des variations importantes liées aux conditions de la fibroscopie.</p>

## Fiche 13.4

### **Immunophénotypage des principales populations lymphocytaires (T, B, NK) dans le LCR ou autres milieux biologiques**

#### **Signification biologique du paramètre**

Les populations lymphocytaires (lymphocytes T, lymphocytes B et lymphocytes NK) comportent de nombreuses sous-populations qui peuvent être identifiées à l'aide des antigènes de différenciation CD qu'elles expriment à leur surface. Dans divers contextes pathologiques, il est pertinent de rechercher la présence anormale de ces populations dans des liquides biologiques, tels que LCR, liquide pleural, ascite, ponction de chambre antérieure de l'œil, épanchement synovial.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Cet immunophénotypage des populations lymphocytaires T, B et NK permet de déterminer

leurs proportions relatives au sein des lymphocytes de l'échantillon. Certains profils peuvent orienter le diagnostic vers un processus infectieux (VIH, tuberculose) ou être une aide diagnostique pour certaines pathologies inflammatoires (sarcoïdoses, lupus, uvéites...) ou hématologiques (leucémies et lymphomes).

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Il s'agit d'un examen de deuxième intention pour l'aide au diagnostic.

<b>Nature du prélèvement</b>	Liquide prélevé sur tube EDTA ou sur tube sec pour les liquides non coagulables.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée ou réfrigérée si délai > 2 heures.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée si < 1 heure, réfrigérée si > 1 heure pour assurer un délai maximal de traitement d'une demi-journée.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>L'immunophénotypage des populations lymphocytaires T, B et NK repose sur la réalisation d'un multimarquage en un ou plusieurs tubes incluant CD45, des marqueurs T (CD3, CD4, CD8), NK (CD16-CD56 ou CD56 seul) et éventuellement B (CD19), suivi d'une mesure en cytométrie en flux. Le marquage peut être réalisé après centrifugation pour concentrer l'échantillon et est effectué à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents suivi si nécessaire d'une lyse des globules rouges sans lavage.</p> <p>La population lymphocytaire est sélectionnée sur le cytomètre en flux selon des critères morphologiques (cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD45 (panleucocytes)/ structure) et corrélée à l'évaluation des cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD3 (pan-T), par les anticorps anti-CD4 et/ou anti-CD8 coexprimant CD3 (lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> respectivement) et par l'anticorps anti-CD19 (lymphocytes B). Les cellules NK sont repérées par l'absence d'expression de CD3 et CD19 et la positivité du marquage par les anticorps CD16 et/ou CD56.</p> <p>Le marquage des lymphocytes B, T et NK peut être complété par des marquages d'activation et/ou de différenciation.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Méthode sensible et spécifique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>Il faut tenir compte du caractère potentiellement hémorragique du prélèvement et étudier si nécessaire en parallèle le sang périphérique du patient.</p> <p>Les immunophénotypages nécessitent des compétences spécifiques techniques et d'interprétation.</p>

## Fiche 13.5

### **Caractérisation immunophénotypique approfondie des lymphocytes T, B, NK (stade de différenciation, état d'activation, populations régulatrices, répertoire)**

#### Signification biologique du paramètre

Les populations lymphocytaires sanguines, lymphocytes T, lymphocytes B et lymphocytes NK, comportent de nombreuses sous-populations qui peuvent être identifiées et caractérisées de façon approfondie (stade de différenciation, activation, capacités régulatrices, répertoire) à l'aide des antigènes de différenciation CD qu'elles expriment à leur surface. Des modifications particulières sont associées à divers contextes pathologiques.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La caractérisation immunophénotypique approfondie des sous-populations de lymphocytes T, B et NK

permet de déterminer leurs proportions relatives au sein de la population lymphocytaire ou leur valeur absolue. Ces examens sont utiles pour explorer les déficits immunitaires primitifs ou acquis, des réponses T spécifiques, la qualité d'une reconstitution immunitaire et les désordres immunologiques (infection, auto-immunité) susceptibles de perturber l'équilibre de ces sous-populations lymphocytaires.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'un examen de seconde voire de troisième intention réalisé dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un seul tube de 1 à 5 mL de sang prélevé de préférence sur EDTA ou héparinate de lithium.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le volume d'anticoagulant ne doit pas entraîner de dilution de l'échantillon si les mesures en valeur absolue en simple plateforme sont déterminées.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon en 24 heures, en particulier pour les mesures en valeur absolue en simple plateforme. Un délai plus long doit être validé par le laboratoire.
<b>Principe méthodologique</b>	L'immunophénotypage repose sur la réalisation d'un multimarquage suivi d'une mesure en cytométrie en flux. Le marquage est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques des marqueurs d'intérêt sur sang total suivi d'une lyse des globules rouges. La population lymphocytaire est sélectionnée sur le cytomètre en flux selon des critères morphologiques (cellules marquées positivement par l'anticorps anti-CD45 (panleucocytes)/structure) et corrélée à l'évaluation des cellules marquées positivement : marqueurs d'activation (CD69, CD25, CD38, HLA-DR...), caractérisant un immunophénotype naïf/mémoire/effecteur (CD45RA, CD45RO, CD31, CD62L, CCR7, CD27, CD28, IgM, IgD...), régulateur (CD4/CD25, CD127, CD45RA...), de répertoire (chaînes du récepteur T), de lymphocytes spécifiques d'antigènes (multimères HLA/peptide antigénique) ou, pour les lymphocytes B, de restriction d'usage des chaînes légères d'immunoglobulines (après lavage pour éliminer les immunoglobulines plasmatiques). Certains marqueurs exprimés dans le cytoplasme ou le noyau (Ki67, Foxp3...) nécessitent la perméabilisation des lymphocytes.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée : préparateur de marquage, automate de lyse.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative. Interprétation en fonction de normes réalisées dans le laboratoire sur des sujets sains de différentes tranches d'âge ou publiées dans la littérature.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Méthode sensible et spécifique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les immunophénotypages nécessitent des compétences spécifiques techniques et d'interprétation.

## Bibliographie du chapitre 13

FICHE 13.1 – Numération des lymphocytes T CD4 et CD8

MMWR 2003; 42(n° 2). [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).

Backteman K, et al. Biological and methodological variations of lymphocyte subsets in blood of human adults. *J Immunol Methods* 2007; 332 : 20–7.

Blanc C, et al. Intérêt de la numération absolue par cytométrie en flux et du quadruple marquage des sous-populations lymphocytaires lors de l'infection par le VIH. *RFL* 1996; 287 : 59–64.

Boutitie F, et al. Predictive value of repeated measurements of CD4 lymphocyte counts on progression to AIDS. *AIDS* 1994; 8 : 35–41.

Dybul M, et al. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents; the panel on clinical practices for treatment of HIV. *Ann Intern Med* 2002; 137 : 381–433.

Plonquet A, et al. Immune risk phenotype is associated with nosocomial lung infections in elderly in-patients. *Immunity and Ageing* 2011; 8 : 8–15.

Shearer WT, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age : the Pediatric AIDS Clinical Trial Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 : 973–80.

FICHE 13.2 – Immunophénotypage des principales populations lymphocytaires circulantes (T, B, NK)

Backteman K, et al. Biological and methodological variations of lymphocyte subsets in blood of human adults. *J Immunol Methods* 2007; 332 : 20–7.

Blanc C, et al. Intérêt de la numération absolue par cytométrie en flux et du quadruple marquage des sous-populations lymphocytaires lors de l'infection par le VIH. *RFL* 1996; 287 : 59–64.

Plonquet A, et al. Immune risk phenotype is associated with nosocomial lung infections in elderly in-patients. *Immunity and Ageing* 2011; 8 : 8–15.

Shearer WT, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age : the Pediatric AIDS Clinical Trial Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 : 973–80.

FICHE 13.3 – Immunophénotypage des principales populations lymphocytaires (T, B, NK) dans le liquide de LBA

Kolopp-Sarda MN, et al. Discriminative immunophenotype of bronchoalveolar lavage CD4 lymphocytes in sarcoidosis. *Lab Invest* 2000; 80 : 1065–9.

Meyer KC, et al. Variation of bronchoalveolar lymphocyte phenotypes with age in the physiologically normal human lung. *Thorax* 1999; 54 : 697–700.

Stoller JK, et al. The impact of bronchoalveolar lavage cell analysis on clinicians' diagnostic reasoning about interstitial lung disease. *Chest* 1987; 92 : 839–43.

The BAL Cooperative Group Steering Committee. Bronchoalveolar lavage constituents in healthy individuals, idiopathic pulmonary fibrosis, and selected comparison groups. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141 : S169–202.

FICHE 13.4 – Immunophénotypage des principales populations lymphocytaires (T, B, NK) dans le LCR ou autres milieux biologiques

Craig FE, et al. Flow cytometric immunophenotyping of cerebrospinal fluid specimens. *Am J Clin Pathol* 2011; 135 : 22–34.

FICHE 13.5 – Caractérisation immunophénotypique approfondie des lymphocytes T, B, NK (stade de différenciation, état d'activation, populations régulatrices, répertoire)

Liu Z, et al. Elevated CD38 antigen expression on CD8 + T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4 + cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16 : 83–92.

Miyara M, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005; 175 : 8392–400.

Porter, et al. T-cell reconstitution and expansion after hematopoietic stem cell transplantation. T it up! *Bone Marrow Transplant* 2005; 35 : 935–42.

Talmadge JE, et al. Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19 : 161–72.

# Chapitre 14

## **Analyse des fonctions lymphocytaires**

## Fiche 14.1

### Tests de prolifération lymphocytaire T

#### Signification biologique du paramètre

Tous les lymphocytes T sont capables de proliférer de façon non spécifique en présence d'un mitogène. Lors d'une réponse immunitaire T contre un antigène des lymphocytes T mémoire spécifiques sont générés. Une ré-exposition de ces cellules à leur antigène entraîne leur prolifération.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le test de prolifération lymphocytaire T consiste à évaluer lors d'une stimulation *in vitro* la capacité de prolifération des lymphocytes T en réponse à un stimulus non spécifique (mitogènes) ou spécifique (antigènes vaccinaux, antigènes infectieux, métaux, médicaments...). Le test mesure soit la répllication d'ADN, mise en évidence par l'incor-

poration d'un marqueur, soit la dilution d'un traceur incorporé dans le cytoplasme des cellules au cours des divisions cellulaires. Les tests de prolifération aux mitogènes (phytohémmagglutinine, anticorps anti-CD3, PMA...) et aux antigènes notamment vaccinaux (anatoxine tétanique, tuberculine, poliovirus...) sont indiqués en cas de suspicion d'un déficit immunitaire héréditaire ou acquis. Les tests de prolifération à d'autres antigènes relèvent de l'exploration d'hypersensibilités retardées (protéines du lait de vache, béryllium, titane, nickel, médicaments...).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Examen de seconde intention dans le bilan d'un déficit immunitaire ou d'une hypersensibilité.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un tube de sang de 7 mL prélevé préférentiellement sur héparinate de lithium ou citrate. Le volume peut être augmenté en cas de déficit immunitaire ou de suspicion de sensibilisation aux métaux ou médicaments.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée. Des températures ambiantes < 20 °C nuisent à la qualité de l'analyse (attention au transport en période hivernale).
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon de 24 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Les cellules mononucléées sanguines isolées par gradient de densité (Ficoll) sont mises en culture en présence de l'agent stimulant d'intérêt pour une période de 3 à 7 jours. Des témoins positif (stimulation non spécifique des lymphocytes T par des mitogènes) et négatif (cellules mononucléées seules) sont réalisés. Trois méthodes peuvent être utilisées pour révéler la réponse proliférative des lymphocytes T :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– incorporation de thymidine tritiée (<math>^3\text{H}</math>) : c'est la technique de référence. La thymidine <math>^3\text{H}</math> ajoutée 16 heures avant la fin de la culture est incorporée par les cellules en prolifération lors de la phase S de synthèse d'ADN du cycle cellulaire. À la fin de la culture, les cellules sont lavées, transférées sur filtre, et la radioactivité incorporée est mesurée à l'aide d'un compteur <math>\beta</math> à scintillation liquide ou solide. Un index de prolifération est calculé par rapport à l'incorporation de thymidine <math>^3\text{H}</math> des cellules autologues non stimulées ;</li> <li>– incorporation d'EdU (5-éthynyl-2'-déoxyuridine) : cet analogue de la thymidine est incorporé dans les lymphocytes T qui prolifèrent ; ceux-ci sont identifiés par cytométrie en flux après marquage intracellulaire de l'EdU ;</li> <li>– dilution du CFSE (carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester) : avant la mise en culture, les cellules sont marquées par un traceur fluorescent, le CFSE qui forme des liaisons covalentes stables avec des molécules intracellulaires. Au cours de la culture, à chaque division cellulaire, le CFSE est dilué entre les cellules filles. À la fin de la culture, la fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux, permettant d'identifier les lymphocytes T ayant subi une ou plusieurs divisions cellulaires en fonction de leur intensité de fluorescence.</li> </ul>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonne valeur prédictive positive.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La positivité des tests de prolifération aux antigènes repose sur une sensibilisation antérieure à l'antigène par vaccination ou infection dans le cas des antigènes infectieux. Les tests concernant des antigènes vaccinaux sont interprétables pendant les deux années qui suivent la vaccination et un test négatif au-delà de ce délai nécessite la réalisation d'un nouveau test de prolifération après un rappel vaccinal. La positivité d'un test de prolifération lymphocytaire au béryllium doit être vérifiée 3 mois après obtention d'un premier test positif. La sensibilité peut être prise en défaut pour les médicaments si l'immunisation est développée vis-à-vis d'un métabolite. La réalisation de ces tests nécessite des compétences spécifiques techniques et d'interprétation.

## Fiche 14.2

## Analyse de la capacité de production de cytokines des lymphocytes T après stimulation polyclonale

### Signification biologique du paramètre

Lors d'une réponse immune à médiation cellulaire, les lymphocytes T activés produisent différents profils de cytokines caractéristiques de leur fonction. Pour tester la fonctionnalité des lymphocytes T d'un patient, leur capacité de production de cytokines déclenchée par une stimulation polyclonale *in vitro* peut être évaluée. Le profil Th1 est le plus généralement exploré.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Après activation non spécifique (polyclonale) par des mitogènes, les lymphocytes T sécrétant des

cytokines Th1 peuvent être quantifiés par la détection d'une ou de plusieurs des cytokines qu'ils produisent (IL-2, IFN- $\gamma$ ). Cet examen est utile pour explorer principalement les déficits immunitaires primitifs ou acquis et la qualité des réponses immunitaires.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Cet examen est réalisé en seconde intention dans le bilan d'un déficit ou d'un dysfonctionnement immunitaire.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un tube de sang de 7 mL prélevé préférentiellement sur héparinate de lithium ou citrate. Le volume peut être augmenté en cas de déficit immunitaire.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée. Des températures ambiantes < 20 °C nuisent à la qualité de l'analyse (attention au transport en période hivernale).
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon de 24 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	La technique d'évaluation des cytokines intracellulaires en cytométrie en flux permet d'identifier précisément les cellules productrices et d'en quantifier la proportion en pourcentage. Le test peut être réalisé directement sur sang total ou sur des cellules isolées par gradient de Ficoll. Les lymphocytes T sont stimulés par des mitogènes (activation polyclonale par différentes combinaisons PMA/ionomycine, CD3/CD28...) pendant une durée d'environ 4 heures en présence d'un agent bloquant la sécrétion extracellulaire des protéines (monensine ou brefeldine) pour permettre l'accumulation des cytokines en intracellulaire. Un témoin négatif est réalisé en parallèle. Après le temps de culture, les cellules sont lavées puis marquées par des anticorps monoclonaux fluorescents caractérisant les sous-populations de lymphocytes T (CD3, CD4, CD8...). Après perméabilisation, elles sont marquées avec des anticorps dirigés contre les cytokines d'intérêt. Le pourcentage de cellules T sécrétant la ou les cytokines d'intérêt est déterminé par cytométrie en flux après soustraction de la production spontanée mesurée dans les cellules non stimulées.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonnes.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La combinaison d'immunophénotypages membranaires et d'immunomarquages intracytoplasmiques nécessite des compétences spécifiques techniques et d'interprétation.

## Fiche 14.3

### Test d'exploration fonctionnelle de l'apoptose des lymphocytes T

#### Signification biologique du paramètre

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme régulateur essentiel de l'homéostasie cellulaire (élimination de cellules sénescents, dangereuses, devenues inutiles...). Elle permet entre autres l'élimination des lymphocytes dysfonctionnels ou autoréactifs du système immunitaire. C'est également un processus apoptotique qui est impliqué dans l'élimination des lymphocytes spécifiques produits après une réponse immunitaire. Un dysfonctionnement de ce programme peut s'avérer délétère pour l'organisme : en particulier, un défaut d'apoptose peut conduire au développement de syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns (ALPS). Deux voies principales d'activation de l'apoptose sont actuellement identifiées : la voie extrinsèque des récepteurs à domaines de mort (Fas, TNF) et la voie intrinsèque mitochondriale. Des défauts génétiques du gène *FAS* sont le plus souvent en cause mais des altérations d'autres voies d'apoptose lymphocytaire pourraient conduire à la même maladie.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Après culture *in vitro* de lymphocytes T, les principales voies d'apoptose cellulaire sont activées et le pourcentage de mort cellulaire est analysé en cytométrie en flux. Ce test fonctionnel explorant l'apoptose des lymphocytes T est essentiellement proposé pour diagnostiquer et explorer les patients suspects de défauts génétiques des gènes *FAS* et *FASL*.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'une analyse de troisième intention réalisée pour des patients suspects d'ALPS si les biomarqueurs sont positifs (excès de lymphocytes T double négatifs, élévation du FasL et de l'IL-10 plasmatique) et que l'identification du défaut génétique n'a pas abouti.

Ce test est réalisé dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un tube de 10 mL prélevé préférentiellement sur héparinate de lithium.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée. Des températures ambiantes < 20 °C nuisent à la qualité de l'analyse (attention au transport en période hivernale).
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer une réalisation maximale dans les 48 heures. Limiter au maximum le délai entre le prélèvement et la réalisation du test.
<b>Principe méthodologique</b>	Après isolement, les lymphocytes T sont cultivés 9 jours en présence de PHA et d'IL-2. Le test fonctionnel de l'apoptose est ensuite déclenché par incubation avec de l'AP01 (anti-CD95 ou anti-Fas, apoptose dépendante de Fas), de la sulfasalazine (apoptose mitochondriale) ou par une privation en IL-2 (apoptose par privation en facteur de croissance). Le pourcentage de lymphocytes T en apoptose est analysé par cytométrie en flux par un multimarqueur associant des marqueurs T et la combinaison annexine V/iodure de propidium. Cet examen doit être impérativement réalisé en parallèle avec des cellules provenant d'un sujet sain.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonnes spécificité et sensibilité.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Il s'agit d'une technique complexe dépendant de la qualité du prélèvement. De faux négatifs sont possibles en cas de mutation somatique de <i>FAS</i> (les cellules mutées disparaissent lors de la culture). Cet examen est réalisé dans un nombre restreint de laboratoires.

## Fiche 14.4

### Quantification des lymphocytes T spécifiques d'antigènes

#### Signification biologique du paramètre

À l'issue d'une réponse lymphocytaire T adaptative, un contingent de lymphocytes T CD4 et CD8 mémoire persiste dans l'organisme. En cas de réintroduction de l'antigène, les cellules T mémoire spécifiques de l'antigène sont plus facilement activées et exercent rapidement leurs fonctions. Pour tester chez un patient son immunité T spécifique vis-à-vis d'un antigène auquel il a été antérieurement exposé, on peut évaluer la capacité de production de cytokines de ses lymphocytes T spécifiques de l'antigène en les activant *in vitro* par cet antigène et quantifier les cellules répondeuses.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les lymphocytes T préalablement sensibilisés *in vivo* (lymphocytes mémoire effecteurs et effecteurs) sont capables de répondre *in vitro* à une stimulation antigénique courte et peuvent être quantifiés par la détection d'une ou de plusieurs

des cytokines qu'ils produisent (par exemple l'IFN- $\gamma$ ). Cette quantification peut être réalisée en ELISPOT ou en cytométrie en flux par la détection des cytokines intracytoplasmiques. Ces tests permettent notamment d'analyser quantitativement (nombre de cellules répondeuses) et qualitativement (type de cytokines sécrétées) les réponses lymphocytaires T spécifiques d'antigènes infectieux et tumoraux. Ils permettent d'évaluer les réponses lymphocytaires T spécifiques de virus (EBV, CMV, BKV, etc.) chez les patients immunodéprimés ou spécifiques d'antigènes tumoraux dans le cadre de protocoles d'immuno-intervention en cancérologie.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce test a sa place dans un bilan immunitaire en seconde voire troisième intention et est réalisé dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un tube de sang de 7 mL prélevé préférentiellement sur héparinate de lithium ou citrate. Le volume peut être augmenté en cas de déficit immunitaire. Le test ELISPOT est potentiellement réalisable à partir de tout liquide d'épanchement contenant des lymphocytes en nombre suffisant, ainsi que sur des LBA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante tempérée. Des températures ambiantes < 20 °C nuisent à la qualité de l'analyse (attention au transport en période hivernale).
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon de 24 heures. Une étape de congélation des lymphocytes en DMSO après séparation (Ficoll) est recommandée en cas de délai > 24 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	Les cellules mononucléées sanguines isolées par gradient de densité (Ficoll) sont mises en culture en présence de l'agent stimulant d'intérêt pour une durée dépendant du test et du stimulant utilisés. Des témoins positif (stimulation non spécifique des lymphocytes T par un mitogène) et négatif (cellules mononucléées seules) sont réalisés. Dans le test ELISPOT, les cellules sont mises en culture en présence de l'agent stimulant d'intérêt (peptides immunogènes, pools de peptides chevauchants, protéines...) dans des puits dont le fond est une membrane sur laquelle est adsorbé un anticorps monoclonal de capture de la cytokine choisie. Après 16 à 40 heures de culture, les cellules sont éliminées par lavage et la cytokine capturée est révélée par un anticorps secondaire conjugué et une révélation colorimétrique. Chaque cellule productrice de cytokine est visualisée sous forme d'une tache colorée (ou spot) sur la membrane. Le nombre de spots par puits est déterminé au microscope, à la loupe, ou idéalement de façon semi-automatisée à l'aide d'un lecteur dédié. Le résultat est rendu en nombre de cellules formant spots ( <i>Spot Forming Cells</i> , SFC). Pour la détection intracytoplasmique en cytométrie en flux des cytokines produites, les cellules sont mises en culture en présence de l'agent stimulant et d'un agent bloquant la sécrétion extracellulaire des protéines pour permettre l'accumulation des cytokines en intracellulaire. Après le temps de culture, les cellules sont lavées puis marquées pour mesurer la viabilité cellulaire et/ou détecter de molécules de surface caractérisant les sous-populations T. Après perméabilisation, elles sont marquées avec des anticorps dirigés contre les cytokines recherchées. Le pourcentage de cellules T spécifiques sécrétant la ou les cytokines d'intérêt est déterminé par cytométrie en flux. Cette méthode permet d'évaluer la sécrétion concomitante de plusieurs cytokines (identification de cellules polyfonctionnelles) ainsi que de caractériser le phénotype et l'état de différenciation des lymphocytes T spécifiques d'antigène.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, lecture semi-automatisée : ELISPOT. Semi-automatisée, automate de lyse : cytométrie.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Maison, national (réseau de laboratoires).
<b>Performances du test</b>	Bonne valeur prédictive positive. Dans la situation d'analyse de cellules rares en cytométrie, le seuil de positivité suggéré est de 0,01 % de lymphocytes T positifs pour une cytokine donnée après soustraction du bruit de fond des cellules seules. Pour l'ELISPOT, le test est considéré comme positif si le nombre de spots est $\geq 5$ ou 10 (selon les antigènes testés) pour $10^5$ cellules après soustraction du bruit de fond.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La fiabilité de l'énumération dépend de la qualité technique du test (comptage et pipetage des cellules). La sensibilité du test est diminuée voire ininterprétable lorsqu'il existe un nombre élevé de spots en l'absence d'antigène, situation fréquente à la phase aiguë d'une infection. Une culture <i>ex vivo</i> et l'addition de cytokines peuvent être nécessaires dans le cas de réponses spécifiques T de faible fréquence (réponses antitumorales). Ces deux approches méthodologiques nécessitent des compétences techniques spécifiques et d'interprétation.

## Fiche 14.5

### Étude de la capacité cytotoxique des lymphocytes T CD8 (test de dégranulation et autres tests)

#### Signification biologique du paramètre

Lorsque les cellules T cytotoxiques (CTL) reconnaissent des cellules cibles, le contenu des granules lytiques, y compris des protéines telles que perforine, granzymes et granulysine, sont sécrétées par dégranulation. Les molécules CD107a (également connu sous le nom de protéine de membrane associée au lysosome 1, LAMP-1) et CD107b sont des glycoprotéines présentes dans la membrane des granules cytotoxiques des CTL qui sont alors exposées à la surface cellulaire. La libération du contenu des granules lytiques dans la cellule cible induit sa mort.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'étude de la capacité cytotoxique des lymphocytes T CD8 consiste à évaluer lors d'une stimulation *in vitro* l'état fonctionnel des CTL antiviraux soit par leur capacité à dégranuler soit par leur capacité à lyser une cible. Des activateurs polyclonaux (anticorps spécifiques du complexe

CD3 associé au TCR le plus souvent) sont utilisés pour évaluer une fonction globale. Ce test est indiqué pour le diagnostic de patients présentant un défaut génétique de cytotoxicité (lympho-histiocytose familiale, maladie de Griscelli ou de Chediak-Higashi).

Des cellules autologues infectées par un virus ou incubées avec des peptides antigéniques viraux sont utilisées comme cibles pour évaluer des réponses spécifiques. Dans ce dernier cas, un résultat négatif peut être le témoin d'un déficit ou d'une absence d'exposition au virus. Ce test est indiqué en cas d'infection virale chez d'autres patients immunodéficients pour évaluer le niveau de compétence leurs réponses au virus testé.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'une analyse de seconde intention réalisée dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Deux tubes de 7 mL prélevés sur anticoagulant préférentiellement héparinate de lithium. Le volume peut être augmenté en cas de déficit immunitaire.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée. Des températures ambiantes < 20 °C nuisent à la qualité de l'analyse (attention au transport en période hivernale).
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon de 24 heures. Une étape de congélation des lymphocytes en DMSO après séparation (Ficoll) est recommandée en cas de délai > 24 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Après isolement des cellules mononucléées sanguines par gradient de densité (Ficoll), la fonction des CTL peut être analysée par analyse de la dégranulation des CTL activés en présence de différentes doses d'anticorps anti-CD3 ou de peptides antigéniques viraux. Cette activation entraîne une dégranulation des protéines de mort et l'expression des molécules CD107a et CD107b à la surface des lymphocytes activés. L'intensité de la dégranulation est évaluée par cytométrie en flux et est exprimée en pourcentage des cellules T CD8 exprimant ces molécules sur l'ensemble des cellules T CD8 étudiées. Cet examen doit être fait impérativement en parallèle avec des cellules provenant d'un contrôle sain pour le diagnostic de déficit immunitaire.</p> <p>Il est également possible de réaliser une analyse de la production intracellulaire des molécules lytiques, perforine ou granzymes, des CTL activés en présence d'un tétramère ou d'activateurs polyclonaux. Cette activation, réalisée en présence de brefeldine A qui empêche la sortie des protéines synthétisées <i>de novo</i> du réticulum endoplasmique, entraîne l'accumulation dans le cytoplasme des molécules lytiques, qui sont détectées après perméabilisation membranaire en cytométrie en flux. Le résultat est exprimé en pourcentage des cellules T CD8 exprimant ces molécules sur l'ensemble des cellules T CD8 étudiées.</p> <p>Enfin, l'analyse du relargage de chrome radioactif par des cibles lysées est le test de référence mais il n'est pratiquement plus pratiqué. Il nécessite une activation préalable des CTL puis un test de lyse proprement dit en présence de cibles autologues marquées au chrome radioactif (<sup>51</sup>Cr). La lyse des cellules cibles entraîne un relargage de <sup>51</sup>Cr, détectable dans le surnageant. L'intensité de la lyse est exprimée en pourcentage par rapport à la lyse maximale (contrôle positif) après déduction du bruit de fond (contrôle négatif). Un traceur non radioactif tel que l'europlum peut être utilisé.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative pour les tests en cytométrie en flux. Semi quantitative (résultats communiqués sous forme de réponse positive ou négative dérivée de valeurs quantitatives) pour les tests de relargage de <sup>51</sup> Cr.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonne spécificité ; sensibilité excellente (activation polyclonale) à faible (activation par certains antigènes viraux).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Technique complexe. Taux d'échecs techniques dépendant de la qualité du prélèvement ou des virus testés. Variabilité des résultats et faux négatifs possibles en particulier pour les virus donnant lieu à des réponses faibles.

## Fiche 14.6

### Étude de la fonction des lymphocytes NK

#### Signification biologique du paramètre

Lorsque les lymphocytes NK reconnaissent des cellules cibles, ils sont activés et sécrètent des cytokines, en particulier de l'IFN- $\gamma$ . Cette activation entraîne également la sécrétion du contenu des granules lytiques, y compris des protéines telles que la perforine, les granzymes et la granulysine, par dégranulation. Les molécules CD107a (également connue sous le nom de protéine de membrane associée au lysosome 1, LAMP-1) et CD107b sont des glycoprotéines présentes dans la membrane des granules cytotoxiques des CTL qui sont alors exposées à la surface cellulaire. La libération du contenu des granules lytiques dans la cellule cible induit sa mort.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'étude de la fonction des lymphocytes NK consiste à évaluer lors d'une stimulation *in vitro* leur état

fonctionnel soit par leur capacité à synthétiser de l'IFN- $\gamma$  soit par leur capacité à dégranuler après activation par des activateurs polyclonaux.

Ces tests sont indiqués pour évaluer le niveau de compétence des réponses des patients immunodéficients. Le test de dégranulation est indiqué pour le diagnostic de patients présentant un défaut génétique de cytotoxicité (lympho-histiocytose familiale, maladie de Griscelli ou de Chediak-Higashi).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'une analyse de seconde intention réalisée dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Deux tubes de 7 mL prélevés sur anticoagulant préférentiellement héparinate de lithium. Le volume peut être augmenté en cas de déficit immunitaire.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée. Des températures ambiantes < 20 °C nuisent à la qualité de l'analyse (attention au transport en période hivernale).
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon de 24 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Après isolement des cellules mononucléées sanguines par gradient de densité (Ficoll), la fonction des lymphocytes NK est étudiée par analyse de la dégranulation des lymphocytes NK activés en présence de la lignée K562 (lignée érythroleucémique spontanément sensible à la lyse NK) ou de la lignée P815 (lignée murine de mastocytome FcγR<sup>+</sup>) recouverte d'anticorps anti-CD16 ou anti-NKG2D. Cette activation entraîne une dégranulation des protéines de mort et l'expression des molécules CD107a et CD107b à la surface des lymphocytes NK activés. L'intensité de la dégranulation est évaluée par cytométrie en flux et est exprimée en pourcentage des cellules NK exprimant ces molécules sur l'ensemble des cellules NK étudiées. Cet examen doit être fait impérativement en parallèle avec des cellules provenant d'un contrôle sain pour le diagnostic de déficit immunitaire.</p> <p>Il est également possible de réaliser une analyse de la production intracellulaire d'IFN-γ des lymphocytes NK activés par des cytokines comme l'IL-2 et l'IL-18. Cette activation, en présence d'un agent bloquant la sécrétion extracellulaire des protéines (monensine ou brefeldine) qui permet l'accumulation de l'IFN-γ. Un témoin négatif est réalisé en parallèle. Après activation, les cellules sont lavées, marquées en membrane par des anticorps monoclonaux fluorescents permettant de caractériser les lymphocytes NK (CD3, CD56, etc.) et après perméabilisation en intracytoplasmique avec un anticorps anti-IFN-γ. Le pourcentage de cellules NK sécrétant l'IFN-γ est déterminé par cytométrie en flux après soustraction de la production spontanée des cellules non stimulées.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonnes.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Technique complexe.

## Fiche 14.7

### **Étude microscopique du cheveu pour l'exploration de certains défauts génétiques de cytotoxicité**

#### **Signification biologique du paramètre**

Les syndromes de Griscelli et de Chediak-Higashi sont caractérisés par la présence de granulations anormales du cheveu visibles en microscopie optique. Les deux syndromes peuvent être distingués sans ambiguïté par l'aspect différent des amas de pigment dans la gaine du cheveu.

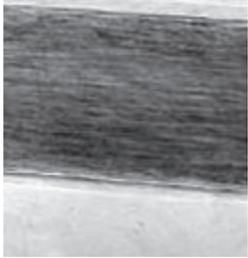
#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Suspicion d'un syndrome de Griscelli ou de Chediak-Higashi devant un patient présentant un

albinisme partiel, des signes cliniques et/ou biologiques d'activation lympho-histiocytaire.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Première intention pour diagnostiquer un albinisme partiel d'un syndrome de Griscelli ou de Chediak-Higashi.

<b>Nature du prélèvement</b>	Cheveux.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Au moins 2 cm.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Température ambiante.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Examen du cheveu entre lame et lamelle avec une goutte d'huile à l'aide d'un microscope optique en le comparant avec un cheveu normal.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Griscelli</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Cheveu normal</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>Chediak-Higashi</p> </div>
<b>Type de Méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de Mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Non.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Variable en fonction de l'investigateur, d'où la nécessité d'un investigateur expérimenté.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Absence d'huile. Cet examen est réalisé dans un nombre restreint de laboratoires.

## Bibliographie du chapitre 14

- FICHE 14.1 – Tests de prolifération lymphocytaire T  
 Klein R, et al. Diagnostic relevance of the lymphocyte transformation test for sensitization to beryllium and other metals (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem* 2004; 76 : 1269–81.
- Mackall CL, et al. Prolonged CD4 depletion after sequential autologous peripheral blood progenitor cell infusions in children and young adults. *Blood* 2000; 96 : 754–62.
- Nachbaur D, et al. Phenotypic and functional lymphocyte recovery after CD34 + – enriched versus non-T-cell depleted autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9 : 727–36.
- Picard C. Comment explorer un déficit immunitaire? *Rev Prat* 2007; 57 : 1671–6.
- Radvany RM, et al. Lymphocytes subpopulation profiles and mitogen kinetics in immunological deficiency testing. *J Clin Immunol* 1987; 7 : 312–8.
- FICHE 14.2 – Analyse de la capacité de production de cytokines des lymphocytes T après stimulation polyclonale  
 Netea MG, et al. Two patients with cryptococcal meningitis and idiopathic CD4 lymphopenia : defective cytokine production and reversal by recombinant interferon- $\gamma$  therapy. *Clin Infect Dis* 2004; 39 : 83–7.
- FICHE 14.3 – Test d'exploration fonctionnelle de l'apoptose des lymphocytes T  
 Magerus-Chatinet A, et al. FAS-L, IL-10, and double-negative CD4–CD8- TCR alpha/beta + T cells are reliable markers of auto-immune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* 2009; 113 : 3027–30.
- Magerus-Chatinet A, et al. Onset of auto-immune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *J Clin Invest* 2011; 121 : 106–12.
- Neven B, et al. A survey of 90 patients with auto-immune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation. *Blood* 2011; 118 : 4798–807.
- FICHE 14.4 – Quantification des lymphocytes T spécifiques d'antigènes  
 Chauvat A, et al. Clinical validation of IFN $\gamma$ /IL-10 and IFN $\gamma$ /IL-2 FluoroSpot assays for the detection of Tr1 T cells and influenza vaccine monitoring in humans. *Hum Vaccin Immunother* 2013; Oct 1; 10(1). [Epub ahead of print].
- Godet Y, et al. Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes : potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin Cancer Res* 2012; 18 : 2943–53.
- Samri, et al. Evaluation of the interlaboratory concordance in quantification of human immunodeficiency virus-specific t cells with a gamma interferon enzyme-linked immunospot assay. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13 : 684–97.
- Sukdolak S, et al. CMV-, EBV- and ADV-specific T-cell immunity : screening and monitoring of potential third-party donors to improve post-transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; 19 : 1480–92.
- Sun Y, et al. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T-cells. *J Immunol Methods* 2003; 242 : 23–34.
- FICHE 14.5 – Étude de la capacité cytotoxique des lymphocytes T CD8 (test de dégranulation et autres tests)  
 Betts MR, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8 + T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003; 281 : 65–78.
- Bryceson YT, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* 2012; 119 : 2754–63.
- Nehme N, et al. Syndromes hémophagocytaires d'origine génétique. *Rev Méd Génét Hum* 2010; 1 : 34–44.
- FICHE 14.6 – Étude de la fonction des lymphocytes NK  
 Bryceson YT, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood* 2012; 119 : 2754–63.
- Nehme N, et al. Syndromes hémophagocytaires d'origine génétique. *Rev Méd Génét Hum* 2010; 1 : 34–44.
- FICHE 14.7 – Étude microscopique du cheveu pour l'exploration de certains défauts génétiques de cytotoxicité  
 Ménasché G, et al. Defect in lytic granule exocytosis : several causes, a same effect. *Med Sci* 2006; 22 : 733–8.

# Chapitre 15

## **Dépistage de l'infection tuberculeuse latente par quantification de la production d'IFN- $\gamma$**

## Fiche 15.1

### Test immunologique de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par ELISA-IFN- $\gamma$ (Quantiferon®)

#### Signification biologique du paramètre

Les lymphocytes T mémoire effecteurs spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis* peuvent être identifiés par leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par des antigènes spécifiques de cette bactérie mais absents du BCG et des principales mycobactéries atypiques. La quantification de l'IFN- $\gamma$  sécrété permet de déterminer la présence ou non de ces cellules chez un sujet.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les sujets présentant une infection tuberculeuse latente (ITL) sont à risque de réactivation d'une tuberculose maladie (TM), surtout en situation d'immunodépression. Leur identification et leur traitement permettent de limiter les réactivations et la contamination de nouveaux sujets. La présence de lymphocytes T mémoire effecteurs spécifiques de *M. tuberculosis* dans le sang périphérique indique une ITL. La présence de ces cellules est identifiée par une sécrétion d'IFN $\gamma$  après stimulation *in vitro* par des antigènes du bacille. L'IFN- $\gamma$  produit dans le plasma est mesuré par un test ELISA. Les indications de ce test ont été définies

par le Haut Conseil en Santé publique (HCSP) en 2011 :

- pour le dépistage de l'ITL en remplacement de l>IDR dans les situations suivantes :
  - avant une mise en route d'un traitement par anti-TNF $\alpha$ ;
  - au cours d'une enquête autour d'un cas index;
  - chez les enfants migrants de moins de 15 ans;
  - à l'embauche pour le personnel professionnellement exposé;
  - au cours du bilan initial des patients infectés par le VIH;
- dans un contexte de prise en charge pluridisciplinaire, pour l'aide au diagnostic de tuberculose paucibacillaire en cas de diagnostic difficile chez l'enfant ou de tuberculose extrapulmonaire chez l'adulte.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce test fait partie du bilan de première intention selon les recommandations publiées par le HCSP. Chez les patients immunodéprimés ou les sujets contact, un résultat négatif ou indéterminé peut justifier un contrôle.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang prélevé directement sur les trois tubes tests (tubes nul, antigène et mitogène, prélevés dans cet ordre) ou sang prélevé sur héparinate de lithium puis transféré à raison de 1 mL dans les trois tubes tests.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Si le prélèvement est réalisé directement, vérifier que le remplissage des tubes a atteint le niveau de la ligne indicatrice de 1 mL. Agiter doucement environ 10 fois chaque tube test après prélèvement ou remplissage pour décrocher le mitogène ou les antigènes fixés sur les parois.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement rapide à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon de 12 heures.
<b>Mode de conservation</b>	Après réalisation de la stimulation à 37 °C, les tubes centrifugés sont réfrigérés avant réalisation rapide du dosage par ELISA de l'IFN- $\gamma$ .
<b>Principe méthodologique</b>	Le tube contrôle négatif ne contient aucun agent stimulant (tube nul) ; le tube contrôle positif contient un mitogène ; le tube antigène contient des peptides spécifiques de <i>M. tuberculosis</i> (ESAT-6, CFP10, TB7.7). Ces tubes sont incubés pendant 16 à 24 heures à 37 °C. Le plasma de chaque tube est recueilli après centrifugation et la présence d'IFN- $\gamma$ produit en réponse aux stimulations est quantifiée par méthode ELISA. Les résultats exprimés en UI/mL sont interprétés selon les recommandations du fournisseur. Le résultat est dit indéterminé en cas de non-réponse au mitogène ou de production d'IFN- $\gamma$ au-dessus du seuil dans le tube nul.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle : ELISA. Automatisée : système ELISA automatisé.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables. Le test aboutit à un résultat chiffré mais l'interprétation est qualitative : les comptes rendus doivent comporter les résultats quantitatifs des tests et leur interprétation doit être pondérée selon le contexte de prescription.
<b>CIQ</b>	Maison ou commercial.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Très bonne spécificité ; sensibilité aux alentours de 90 % mais moindre dans certaines populations immunodéprimées (enfants < 6 ans, sujets âgés, infection par le VIH, traitements immunosuppresseurs...).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Un résultat positif indique l'existence d'une réponse mémoire effectrice T spécifique mais ne permet pas de dater un contact avec <i>M. tuberculosis</i> ni de témoigner d'une phase active de la maladie. Il existe de rares de faux positifs ( <i>M. marimum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. szulga</i> ) et des faux négatifs. Ce test fondé sur une évaluation fonctionnelle des lymphocytes T est à utiliser et à interpréter avec précaution chez les sujets immunodéprimés. Une zone de difficulté d'interprétation du test est définie dans la littérature entre 0,2 UI/mL et 0,7 UI/mL d'IFN- $\gamma$ .

## Fiche 15.2

### Test immunologique de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par ELISPOT-IFN- $\gamma$ (T-SPOT.TB®)

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les lymphocytes T mémoire effecteurs spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis* peuvent être identifiés par leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par des antigènes spécifiques de cette bactérie mais absents du BCG et des principales mycobactéries atypiques. La quantification de l'IFN- $\gamma$  sécrété permet de déterminer la présence ou non de ces cellules chez un sujet.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Les sujets présentant une infection tuberculeuse latente (ITL) sont à risque de réactivation d'une tuberculose maladie (TM), surtout en situation d'immunodépression. Leur identification et leur traitement permet de limiter les réactivations et la contamination de nouveaux sujets. La présence de lymphocytes T mémoire effecteurs spécifiques de *M. tuberculosis* dans le sang périphérique indique une ITL. Ces cellules sont identifiées en ELISPOT par leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  après stimulation *in vitro* par des antigènes du bacille. Les indica-

tions de ce test ont été définies par le Haut Conseil en Santé Publique (HCSP) en 2011 :

- pour le dépistage de l'ITL en remplacement de l>IDR dans les situations suivantes :
  - avant une mise en route d'un traitement par anti-TNF $\alpha$ ;
  - au cours d'une enquête autour d'un cas index;
  - chez les enfants migrants de moins de 15 ans;
  - à l'embauche pour le personnel professionnellement exposé;
  - au cours du bilan initial des patients infectés par le VIH;
- dans un contexte de prise en charge pluridisciplinaire, pour l'aide au diagnostic de tuberculose paucibacillaire en cas de diagnostic difficile chez l'enfant ou de tuberculose extrapulmonaire chez l'adulte.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce test fait partie du bilan de première intention selon les recommandations publiées par le HCSP. Chez les patients immunodéprimés ou les sujets contact un résultat négatif ou indéterminé peut justifier un contrôle.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang prélevé de préférence sur héparinate de lithium ou citrate. Le test est potentiellement réalisable dans tout liquide biologique contenant des lymphocytes T en nombre suffisant prélevé dans un tube sec.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante tempérée pour assurer un délai maximal de traitement de l'échantillon de 8 heures. Pour des délais plus importants, il existe un stabilisant permettant de porter le délai de conservation à 32 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	Il est recommandé de réaliser les manipulations en environnement stérile (hotte à flux laminaire). Les cellules mononucléées sont isolées par gradient de densité, comptées et déposées à raison de $2,5 \cdot 10^6$ cellules dans 100 $\mu$ L de milieu spécifique (AIM-V) dans les quatre puits du kit T-Spot.TB® recouverts d'anticorps anti-IFN- $\gamma$ . Il s'agit respectivement d'un puits contrôle négatif (milieu seul), d'un puits contrôle positif (PHA) et de deux puits tests «A» et «B» contenant les peptides de <i>M. tuberculosis</i> . Les puits sont incubés 16 à 20 heures à 37 °C puis sont lavés et incubés avec un anticorps secondaire anti-IFN- $\gamma$ conjugué à la phosphatase alcaline. La révélation est effectuée par ajout du substrat enzymatique et d'un chromogène. La présence des spots (correspondant à des cellules sécrétant de l'IFN- $\gamma$ ) est déterminée à l'aide d'un microscope, d'une loupe ou d'un lecteur ELISPOT automatisé. Les résultats exprimés en SFC ( <i>Spot Forming Cells</i> )/puits sont interprétés selon les recommandations du fournisseur.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle ou semi-automatisée (lecteur ELISPOT avec logiciel d'analyse approprié).
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables. Le test aboutit à un résultat chiffré mais l'interprétation est qualitative : les comptes rendus doivent comporter les résultats quantitatifs des tests et leur interprétation doit être pondérée selon le contexte de prescription.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Très bonne spécificité, sensibilité aux alentours de 95 % mais moindre dans certaines populations immunodéprimées (enfants < 6 ans, sujets âgés, infection par le VIH, traitements immunosuppresseurs...).
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Une attention particulière doit être apportée à la qualification technique du personnel car ce test nécessite beaucoup de manipulations cellulaires. Un résultat positif indique l'existence d'une réponse mémoire effectrice T spécifique mais ne permet pas de dater un contact avec <i>M. tuberculosis</i> , ni de témoigner d'une phase active de la maladie. En particulier il n'y a pas dans la littérature de corrélation entre le nombre de spots et le caractère actif de la maladie ni avec une efficacité thérapeutique. Il existe de rares de faux positifs ( <i>M. marimum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. szulgai</i> ) et des faux négatifs. Ce test fondé sur une évaluation fonctionnelle des lymphocytes T est à utiliser et à interpréter avec précaution chez les immunodéprimés. Une zone de difficulté d'interprétation du test est définie dans la littérature entre 6 et 10 spots.

## Bibliographie du chapitre 15

FICHE 15.1 – Test immunologique de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par ELISA-IFN- $\gamma$  (Quantiferon®)

Cattamanchi A, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals : a systematic review and meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011 ; 56 : 230–8.

Diel R, et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection : a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011 ; 37 : 88–99.

Mariette X, et al. Influence of replacing tuberculin skin test with ex vivo interferon  $\gamma$  release assays on decision to administer prophylactic antituberculosis antibiotics before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2012 ; 71 : 1783–90.

Veerapathran A, et al. T-Cell assays for tuberculosis infection : deriving cut- offs for conversions using reproducibility data. *Plos One* 2007 ; 3 : e1850.

Zwerling A, et al. Interferon-gamma release assays for tuberculosis screening of healthcare workers : a systematic review. *Thorax* 2012 ; 67 : 62–70.

Recommandations HCSP : [http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcsp20110701\\_interferongamma.pdf](http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcsp20110701_interferongamma.pdf).

FICHE 15.2 – Test immunologique de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par ELISPOT-IFN- $\gamma$  (T-SPOT.TB®)

Cattamanchi A, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals : a systematic review and meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011 ; 56 : 230–8.

Diel R, et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection : a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011 ; 37 : 88–99.

Mariette X, et al. Influence of replacing tuberculin skin test with ex vivo interferon  $\gamma$  release assays on decision to administer prophylactic antituberculosis antibiotics before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2012 ; 71 : 1783–90.

Veerapathran A, et al. T-Cell assays for tuberculosis infection : deriving cut- offs for conversions using reproducibility data. *Plos One* 2007 ; 3 : e1850.

Zwerling A, et al. Interferon-gamma release assays for tuberculosis screening of healthcare workers : a systematic review. *Thorax* 2012 ; 67 : 62–70.

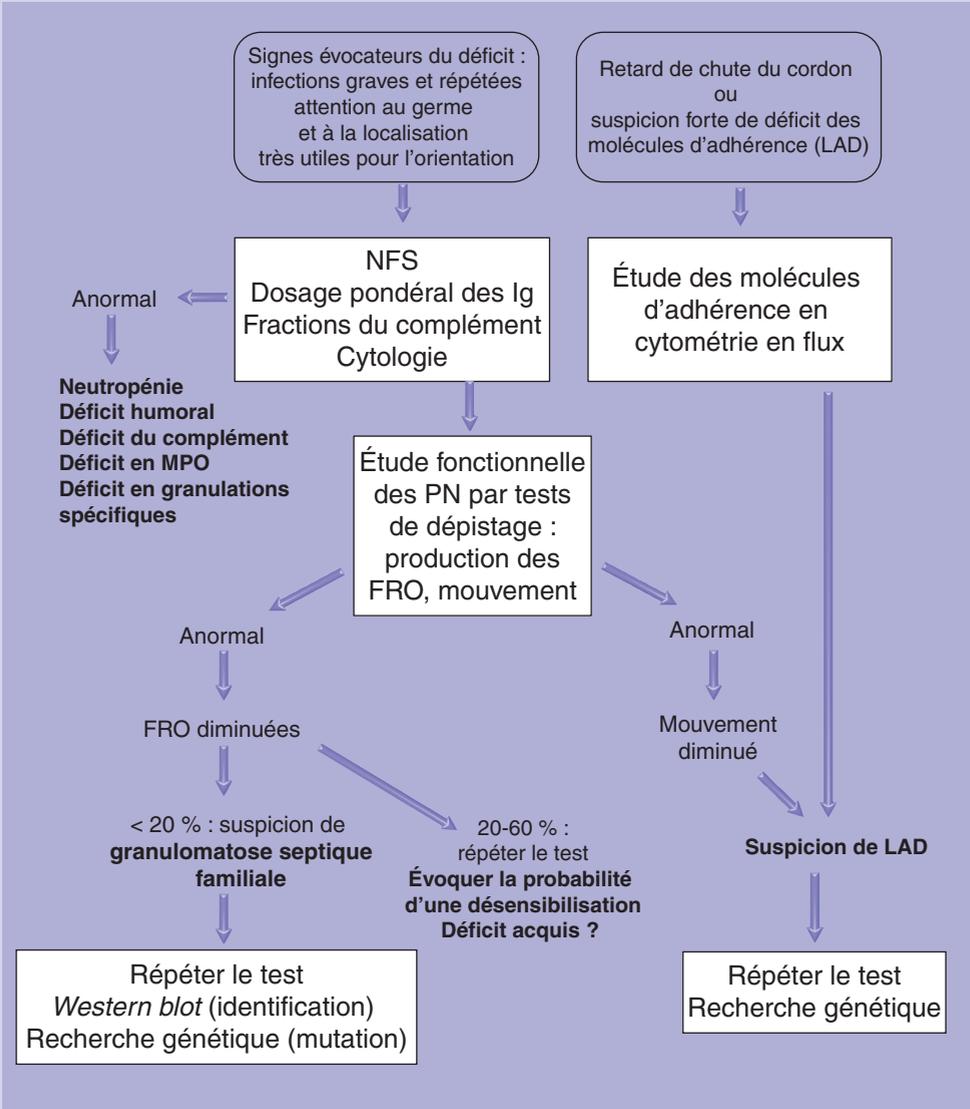
Recommandations HCSP : [http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcsp20110701\\_interferongamma.pdf](http://www.hcsp.fr/docspdf/avisrapports/hcsp20110701_interferongamma.pdf).

# Chapitre 16

## **Exploration des polynucléaires neutrophiles**

Synopsis XVIII

### Stratégie diagnostique des déficits de la fonction des polynucléaires neutrophiles



## Fiche 16.1

## Étude de l'expression des molécules d'adhérence des polynucléaires neutrophiles

### Signification biologique du paramètre

La migration des polynucléaires neutrophiles (PNN) du sang circulant vers le site infectieux est une étape critique dans la défense contre les agents pathogènes. Cette migration trans-endothéliale dépend de différentes molécules d'adhérence, dont Sialyl-LewisX (CD15), les sélectines (CD62P, E, L) responsables du roulement à la surface de l'endothélium et les intégrines  $\beta_2$ , dont l'hétérodimère CD11b/CD18, responsables de l'adhérence de forte affinité, préalable à la transmigration. L'expression des molécules d'adhérence dépend de l'état d'activation des PNN.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Ce test est indiqué en cas de suspicion de déficit quantitatif ou fonctionnel des molécules d'adhérence (LAD) qui s'accompagne d'infections bactériennes

et fongiques récurrentes et, pour les déficits en intégrines  $\beta_2$ , d'une absence de pus au niveau des sites infectés, une hyperleucocytose et un retard de la chute du cordon. Bien que rare, le déficit le plus fréquent est dû à l'absence de synthèse ou à une synthèse anormale de la sous-unité CD18 commune aux intégrines  $\beta_2$  (LAD I). Le déficit en Sialyl-LewisX (LAD II) est exceptionnel. Ce test permet également d'évaluer l'état ou la capacité d'activation des PNN.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce déficit de l'immunité innée est en général recherché après avoir éliminé une neutropénie, un déficit en immunoglobulines ou un déficit de l'activation du complément. Cette recherche est réalisée dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur héparinate de lithium.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température réfrigérée dans les 4 heures suivant le prélèvement au laboratoire en raison de la demi-vie courte des PNN. En cas de destination lointaine, un délai plus long mais de moins de 24 heures est accepté si le prélèvement d'un sujet témoin est réalisé dans les mêmes conditions de transport.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température réfrigérée.
<b>Principe méthodologique</b>	L'exploration de l'expression des molécules d'adhérence se fait par multimarquage réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques des marqueurs d'intérêt sur sang total, suivi d'une mesure en cytométrie en flux. La population de polynucléaires est sélectionnée sur le cytomètre en flux selon des critères morphologiques et l'expression des principales molécules d'adhérence est analysée avant et après stimulation à 37 °C et après activation par différents stimulus (LPS, fMLP...), afin d'écarter une anomalie des voies transductionnelles. L'intégrine CD11b/CD18 est présente à la surface de 10 % des PNN au repos mais 100 % des PNN activés par fMLP. CD62L est présente sur 100 % des PNN au repos puis est relarguée dans le surnageant des PNN activés par fMLP.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performance du test</b>	Excellente.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La recherche d'un déficit d'expression ne pose pas de problème. Ce test peut aussi servir pour mesurer l'état d'activation des PNN chez un patient. Les conditions de prélèvement et de transport sont alors critiques.

## Fiche 16.2

## Exploration du mouvement spontané et du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles

### Signification biologique du paramètre

Le polynucléaire neutrophile (PNN) est une cellule mobile qui se déplace spontanément au hasard ou de façon orientée dans le sens d'un gradient de substances chimioattractantes. La migration orientée correspond au chimiotactisme. Les PNN sont les premières cellules immunitaires à migrer du sang circulant vers un foyer infectieux ou inflammatoire sous l'influence de substances chimioattractantes diffusant à partir du site atteint.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Un défaut de migration peut être dû à différentes causes, telles que des déficits en molécules d'adhérence ou en Rac2, à des désordres du cytosquelette,

à des mutations dans le gène codant le récepteur des N-formylpeptides, etc. La recherche d'un défaut de migration est indiquée devant la survenue d'infections bactériennes et fongiques répétées chez l'enfant, parfois associées à d'autres symptômes comme le retard de la chute du cordon dans le cadre des déficits en molécules d'adhérence.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce déficit de l'immunité innée est en général recherché après avoir éliminé une neutropénie, un déficit en immunoglobulines ou un déficit de l'activation du complément. Cette recherche est réalisée dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur héparinate de lithium.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement dans les 4 heures suivant le prélèvement au laboratoire en raison de la demi-vie courte des PNN. En cas de destination lointaine, un délai plus long mais de moins de 24 heures est accepté si le prélèvement d'un sujet témoin est réalisé dans les mêmes conditions de transport.
<b>Mode de conservation</b>	Température ambiante ou réfrigéré si > 12 heures.
<b>Principe méthodologique du test</b>	Les PNN sont isolés à partir du sang circulant et leur mouvement est mesuré par la méthode de migration sous agarose. Les PNN sont placés dans un puits central, encadré de deux puits opposés contenant l'un le chimioattractant, l'autre un tampon contrôle. La mesure du déplacement du front de migration des PNN vers le chimioattractant est comparée à celle de la migration spontanée en utilisant un microscope inversé et un oculaire micrométrique. Cette technique simple et reproductible mesure simultanément les mouvements spontanés et orientés. La migration des PNN entre deux compartiments séparés par un filtre de pores calibrés et contenant l'un les PNN, l'autre le chimioattractant, est également très utilisée (chambre de Boyden, ou <i>transwell</i> ). Les PNN sont placés dans le compartiment supérieur et le nombre de PNN ayant migré à différents temps vers le compartiment inférieur est mesuré. Cette dernière approche mesure séparément la migration spontanée ou orientée mais est plus coûteuse.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	La migration en agarose est moins sensible que le <i>transwell</i> mais plus reproductible et mesure simultanément la migration spontanée et orientée.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les limites du test sont souvent un nombre insuffisant de PNN isolés à partir de petites quantités de sang chez l'enfant, la migration n'étant pas linéaire en fonction du nombre de PNN. Par ailleurs, une calibration précise du temps de migration est nécessaire.

## Fiche 16.3

### **Exploration de l'explosion oxydative des polynucléaires neutrophiles**

#### **Signification biologique du paramètre**

L'explosion oxydative est la production massive et rapide de formes réactives de l'oxygène (FRO) par la NADPH oxydase des polynucléaires neutrophiles (PNN) stimulés. Elle est nécessaire à la microbicidie. L'absence de production des FRO, due à un déficit d'origine génétique d'un des composants de la NADPH oxydase, conduit à la survenue d'infections bactériennes et fongiques sévères et répétées qui définissent la granulomatose septique chronique.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

La mesure de la production des FRO, comme l'anion superoxyde ou l' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui en dérive, a

pour indication majeure la recherche d'un déficit de la production des FRO par la NADPH oxydase phagocytaire dans un contexte d'infections bactériennes et fongiques répétées chez le jeune enfant mais aussi plus tard dans la vie. Elle conduit à suspecter une granulomatose septique chronique qui doit être confirmée par une étude génétique.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Ce déficit de l'immunité innée est en général recherché après avoir éliminé une neutropénie, un déficit en immunoglobulines ou un déficit de l'activation du complément. Cette recherche est réalisée dans un nombre restreint de laboratoires dans le cadre d'une RCP clinico-biologique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur héparinate de lithium.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement du prélèvement dans les 4 heures suivant le prélèvement au laboratoire en raison de la demi-vie courte des PNN. En cas de destination lointaine, un délai de moins de 24 heures est accepté si le prélèvement d'un sujet témoin est adressé dans les mêmes conditions de transport.
<b>Mode de conservation</b>	Température ambiante ou réfrigéré si > 12 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Le principe général des tests utilisés repose sur la réduction ou l'oxydation d'une molécule par les FRO produites par la NADPH oxydase du PNN activé par différents stimulus.</p> <p>La réduction du cytochrome c par l'anion superoxyde est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm. L'oxydation de molécules comme le luminol conduit à une émission de lumière extracellulaire et/ou intracellulaire, corrélée à la quantité de FRO les ayant oxydées. Cette chimioluminescence est exprimée en cpm. Le nitrobleu de tétrazolium (NBT), jaune à l'état basal, est transformé en précipité noir de formazan par l'anion superoxyde ce qui permet d'évaluer le pourcentage de cellules réduisant le NBT. Différentes sondes fluorogènes (DCFH, DHR123, HE, amplex Red...), non fluorescentes à l'état basal, émettent une fluorescence après oxydation par les FRO. Cette fluorescence peut être mesurée globalement par un fluorimètre (mesure de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite en extracellulaire par l'ampex red) ou par cytométrie en flux après entrée des sondes dans la cellule (DCFH, DHR123, HE).</p> <p>Ces méthodes permettent de mesurer à la fois le pourcentage de cellules productrices et la production globale de FRO.</p> <p>Plusieurs stimulus doivent être utilisés (LPS, bactéries opsonisées, PMA, etc.), afin d'écarter une anomalie des voies transductionnelles.</p> <p>Au moins deux tests différents sont utilisés pour confirmer le résultat.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performance du test</b>	Le test de référence mesurant la production d'anion superoxyde par la NADPH oxydase du phagocyte stimulé est la réduction du cytochrome c inhibable par la superoxyde dismutase. La spécificité de détection des FRO dépend de la sonde utilisée. La chimioluminescence est très sensible. La réduction du NBT est une technique robuste mais demande une expérience dans la lecture.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les molécules tests peuvent être oxydées ou réduites de façon non spécifique et certains médicaments peuvent interférer avec les tests.

## Fiche 16.4

## Analyse de la fonction phagocytaire des polynucléaires neutrophiles

### Signification biologique du paramètre

La phagocytose est le processus par lequel les polynucléaires neutrophiles (PNN), après avoir reconnu un pathogène/micro-organisme, sont capables de l'internaliser afin de l'éliminer. Après reconnaissance, le pathogène/micro-organisme est confiné dans une vacuole, le phagosome. Une phase de maturation entraîne la fusion avec les différentes granulations du PNN, le déversement d'enzymes lytiques et de molécules bactéricides à l'intérieur du phagosome ainsi que le recrutement membranaire du cytochrome b558 et de la NADPH oxydase. Cette maturation conduit à l'acidification du phagolysosome (pH  $\approx$  4,5) et à l'accumulation d'enzymes de dégradation et des formes réactives de l'oxygène (FRO) à l'intérieur du phagolysosome, ce qui assure l'élimination du pathogène/micro-organisme.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

L'analyse de la fonction phagocytaire des PNN est effectuée lors de la recherche d'un déficit de la fonction des PNN, en même temps que l'exploration de la production de formes réactives de l'oxygène et l'exploration du mouvement, dans un contexte d'infections bactériennes et fongiques répétées et/ou chroniques chez le jeune enfant ou l'adulte.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce déficit de l'immunité innée est en général recherché après avoir éliminé une neutropénie, un déficit en immunoglobulines et un déficit de l'activation du complément.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur héparinate de lithium.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Le sang doit parvenir dans les 4 heures suivant le prélèvement au laboratoire en raison de la demi-vie courte des PNN. En cas de destination lointaine, un délai de moins de 24 heures est accepté si le prélèvement d'un sujet témoin est adressé dans les mêmes conditions de transport.
<b>Mode de conservation</b>	Température ambiante ou réfrigéré si > 12 heures.
<b>Principe méthodologique</b>	Le principe général des tests utilisés repose sur l'utilisation de bactéries ou de billes marquées avec un fluorochrome. Après incubation avec les PNN du patient et en présence du complément, le nombre de bactéries ou de particules phagocytées par les PNN est évalué par cytométrie en flux (résultats exprimés en moyenne d'intensité de fluorescence, MFI) ou par observation au microscope (nombre de PNN ayant phagocyté des particules). Il est indispensable de faire la différence entre les bactéries/particules phagocytées et celles qui adhèrent à la surface du PNN. Pour cela, il existe deux possibilités : utiliser un inhibiteur du cytosquelette (cytochalasine D) ou utiliser un fluorochrome qui peut être « éteint » (le FITC est éteint par le bleu de trypan). Dans ce dernier cas, des lavages supplémentaires sont nécessaires afin d'éteindre la fluorescence à la surface des cellules. Plus récemment des fluorochromes n'émettant de fluorescence qu'à pH acide ont été mis au point. Leur utilisation permet de s'assurer de la localisation des particules à l'intérieur du phagolysosome.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative à données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performance du test</b>	L'utilisation d'une sonde fluorogène assure une meilleure sensibilité et reproductibilité de la technique par comparaison au comptage au microscope. Ce dernier permet néanmoins de contrôler <i>de visu</i> l'ingestion des particules.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	La fixation non spécifique à la surface de la membrane cellulaire des particules non englobées est une cause d'erreur.

## Bibliographie du chapitre 16

FICHE 16.1 – Étude de l'expression des molécules d'adhérence des polynucléaires neutrophiles

Gougerot-Pocidal MA, et al. Déficiences fonctionnelles primitives des polynucléaires neutrophiles. *Presse Méd* 2006; 35 : 871–8.

FICHE 16.2 – Exploration du mouvement spontané et du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles

Gougerot-Pocidal MA, et al. Déficiences fonctionnelles primitives des polynucléaires neutrophiles. *Presse Méd* 2006; 35 : 871–8.

Ricevuti G, et al. Assay of phagocytic cell functions. *Allerg Immunol (Paris)* 1993; 25 : 55–66.

FICHE 16.3 – Exploration de l'explosion oxydative des polynucléaires neutrophiles

Gougerot-Pocidal MA, et al. Déficiences fonctionnelles primitives des polynucléaires neutrophiles. *Presse Méd* 2006; 35 : 871–8.

Holland SM. Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013; 27 : 89–99.

FICHE 16.4 – Analyse de la fonction phagocytaire des polynucléaires neutrophiles

Gougerot-Pocidal MA, et al. Déficiences fonctionnelles primitives des polynucléaires neutrophiles. *Presse Méd* 2006; 35 : 871–8.

Hampton MB, et al. Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232 : 15–22.

# Chapitre 17

## **Typages HLA**

## Synopsis XIX

**La nomenclature des typages HLA**

Le typage HLA d'un sujet, plus anciennement dénommé groupage tissulaire, a une écriture très précise reposant sur une nomenclature harmonisée au niveau international. Elle a dû s'adapter à l'immense polymorphisme allélique et à la description permanente de nouveaux allèles. Elle indique la technique employée pour la réalisation du typage.

Lorsqu'un typage HLA est réalisé en **sérologie** par une technique de microlymphocytotoxicité à l'aide d'anticorps anti-HLA, il s'agit d'un **phénotypage HLA** par caractérisation des protéines HLA membranaires. Les antigènes HLA identifiés sont désignés par le nom du locus suivi *immédiatement* d'un nombre : exemple HLA-A2 ; HLA-B27 ; HLA-DR4. Ce numéro désigne un groupe de molécules. Dans le cas du locus C, la lettre «w» est ajoutée au locus HLA-C pour éviter toute confusion avec le système du complément : exemple HLA-Cw4. Pour certaines molécules HLA, il existe des déterminants allotypiques partagés par plusieurs familles. Par exemple, HLA-A9 est partagé par HLA-A23 et HLA-A24. On parle de *split* sérologique.

Lorsqu'un typage HLA est réalisé en **biologie moléculaire** par une technique de PCR-SSO, PCR-SSP ou PCR-SBT, il s'agit d'un **génotypage HLA**. Les gènes du locus HLA étudié sont alors désignés par un premier nombre *précédé d'un astérisque (\*)* pour désigner la famille d'allèles identifiés : exemple : HLA-A\*02 ; HLA-B\*27. Pour le génotypage HLA des molécules de classe II, il s'agit le plus souvent de la détermination du gène codant la chaîne  $\beta$ , d'où l'écriture : HLA-DRB1\*04. Selon la technique employée et les amorces utilisées, le génotypage HLA en biologie moléculaire détermine de manière plus ou moins complète la séquence nucléotidique du gène HLA et atteint différents niveaux de résolution :

- typage HLA **générique**, de basse résolution : le gène du locus HLA étudié est défini par un

nombre à deux chiffres (voire trois) et correspond à une famille d'allèles plus ou moins grande (exemple : gène HLA-A\*02, qui compte aujourd'hui plus de 125 allèles) ; on parle dans ce cas communément d'un typage HLA à deux *digits* ;

- typage HLA « **allélique** », de résolution intermédiaire ou haute : l'allèle du gène HLA étudié est désigné par un deuxième nombre séparé du premier par deux points (« : ») (exemple allèle HLA-A\*02:01) ; on parle communément de typage HLA à quatre *digits*.

Le typage HLA en biologie moléculaire repose principalement sur l'étude ciblée des exons 2 et 3 pour la classe I et de l'exon 2 pour la classe II, qui codent la poche de fixation des peptides, site d'interaction avec le récepteur T des lymphocytes T. Le **véritable typage allélique** d'un gène HLA correspond au séquençage complet des nucléotides d'un allèle HLA.

**Exemples de différentes expressions, pour un sujet donné, du résultat du typage HLA d'un locus HLA-A selon la technique employée et les sondes utilisées**

*En sérologie, par microlymphocytotoxicité*

- **HLA-A9** : antigène HLA identifié par des anticorps anti-HLA-A9, reconnaissant un déterminant antigénique partagé par deux molécules HLA-A différentes : HLA-A23 ou HLA-A24. Le typage HLA-A9 est un typage HLA large/*broad*.

- **HLA-A23** : cet antigène correspond à une des deux subdivisions de l'antigène HLA-A9, spécifiquement reconnue par des anticorps anti-HLA-A23. Le typage HLA-A23 est un *split* sérologique de l'antigène HLA-A9.

*En biologie moléculaire*

- **HLA-A\*23** : typage de basse résolution, générique.

- **HLA-A\*23:01** : typage de haute résolution, « allélique ».

## Fiche 17.1

### Typage HLA de classe I ou II en sérologie par microlymphocytotoxicité

#### Signification biologique du paramètre

Le typage HLA en sérologie a été à la base de la caractérisation du complexe majeur d'histocompatibilité chez l'Homme, ou système HLA (*Human Leucocyte Antigens*). Cette technique permet d'identifier chez un sujet quelles protéines HLA membranaires (antigènes HLA) sont codées par les allèles des différents locus HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ. Elle est toujours pratiquée dans les laboratoires d'histocompatibilité mais ses indications se sont restreintes depuis l'avènement des techniques de biologie moléculaire (PCR-SSO, SSP, séquençage) qui permettent d'atteindre des typages HLA plus résolutifs, jusqu'au niveau allélique.

Le typage HLA en sérologie repose sur l'utilisation d'anticorps anti-HLA spécifiques d'épitopes (déterminants allotypiques) partagés par un groupe de molécules HLA. Son principe est le suivant : lorsqu'un anticorps anti-HLA reconnaît un déterminant antigénique à la membrane d'une cellule, la réaction antigène/anticorps aboutit à la lyse de la cellule en présence de complément.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Cette technique caractérise de manière satisfaisante les antigènes HLA-A et HLA-B d'un sujet et donne, pour la classe I, un niveau de résolution suffisant pour un donneur ou un receveur d'organes ou de plaquettes. En allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, cette approche peut convenir pour une première étape de screening avant un typage au niveau allélique.

Pour le locus HLA-C et les locus de classe II, la résolution est médiocre et limite l'emploi de cette technique.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le typage sérologique permet d'affirmer la synthèse de la protéine HLA par un gène HLA et son expression à la membrane. C'est donc la seule méthode pour écarter un allèle nul quand celui-ci fait partie des ambiguïtés données par le typage d'un locus en biologie moléculaire.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur héparine ou ACD.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante dans les 24 heures.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du prélèvement avant analyse à température ambiante.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Le typage HLA par microlymphocytotoxicité complément-dépendante s'effectue dans des microplaques de Terasaki, dont chaque puits contient des anticorps anti-HLA polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de déterminants antigéniques exprimés par une ou plusieurs familles de molécules HLA. Du complément de lapin est le plus souvent pré-réparti dans chaque puits. Comme les lymphocytes T expriment les antigènes HLA de classe I tandis que les lymphocytes B expriment à la fois les antigènes de classe I et de classe II, une suspension de lymphocytes totaux d'un individu permet la réalisation d'un typage HLA de classe I en sérologie. En revanche, le typage en sérologie des molécules HLA de classe II nécessite la préparation d'une suspension de lymphocytes B par billes magnétiques.</p> <p>Une suspension de lymphocytes du sujet est ajoutée dans chaque puits et mise à incuber à température ambiante. Si les antigènes HLA exprimés par les lymphocytes sont reconnus par les anticorps anti-HLA d'un puits, les lymphocytes de ce puits sont lysés en présence de complément. La lyse est mise en évidence à l'aide de deux colorants vitaux (acridine-orange et bromure d'éthidium). Pour chaque puits, l'existence de lymphocytes lysés (colorés en rouge) ou non lysés (colorés en vert) est déterminée à l'aide d'un microscope à fluorescence inverse.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisée pour la lecture au microscope.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Un témoin négatif permet d'évaluer la viabilité de base des lymphocytes qui doit être supérieure à 90 %. Un témoin positif permet de contrôler l'activité du complément qui doit aboutir à plus de 80 % de lymphocytes lysés.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Les anticorps anti-HLA sont peu performants en termes de spécificité pour distinguer les différentes molécules HLA-C, HLA-DR et HLA-DQ, d'où un niveau de résolution souvent insuffisant. Le typage sérologique HLA-DP n'est pas réalisable en raison de l'absence de plaques disponibles.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Certains sujets présentent un antigène HLA peu fréquent (origine ethnique) pour lequel il n'existe pas d'anticorps anti-HLA spécifiques sur la plaque de typage. En cas de lymphopénie sévère, le typage HLA en sérologie ne peut être pratiqué.

## Fiche 17.2

### Typage HLA de classe I ou II en biologie moléculaire

#### Signification biologique du paramètre

Le typage HLA en biologie moléculaire permet d'identifier chez un sujet quels sont les allèles des gènes HLA qu'il possède au niveau des différents locus de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) et de classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Le développement des techniques de biologie moléculaire (PCR-SSO, PCR-SSP, séquençage) et la mise à disposition de trousse commerciales et de logiciels d'interprétation intégrant la description des nouveaux allèles ont fait privilégier ces méthodes de typage aux dépens du typage HLA par microlymphocytotoxicité. Seules ces approches permettent un typage HLA de haute résolution (à quatre *digits*) indispensable dans les allogreffes de cellules souches avec donneurs non apparentés ou pour l'étude de certains locus HLA comme HLA-DP.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

Selon les trousse commerciales et la technique post-PCR utilisée, le typage HLA en biologie moléculaire permet d'obtenir un typage générique de basse résolution ou un typage « allélique », de haute résolution.

En pratique clinique, les indications principales du typage HLA sont :

- les transplantations d'organes pour lesquelles un typage générique des locus HLA-A, HLA-B et HLA-DR, HLA-DQ suffit dans la majorité des cas;
- les greffes de cellules souches hématopoïétiques où, au contraire, en dehors de greffes familiales où les quatre haplotypes parentaux ont pu être établis, un typage exhaustif et de haute résolution des gènes HLA de classe I et de classe II est requis pour s'assurer du maximum de compatibilité HLA entre le donneur et le receveur;
- certaines pathologies où une liaison ou une association HLA-maladie est décrite. Dans ce cas, le typage HLA est ciblé sur le locus HLA incriminé.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le typage HLA générique précède ou non le typage HLA de haute résolution, selon la technique employée (PCR-SSP) et le cadre clinique de prescription (tests réalisés sur deux prélèvements différents pour confirmer le typage).

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur EDTA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Le sang sur EDTA ou l'ADN extrait du prélèvement sanguin peuvent être conservés congelés (ou réfrigérés pour certaines extractions d'ADN) pour reprise ultérieure de l'échantillon à des fins de complément de typage.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Plusieurs techniques de typage HLA par biologie moléculaire sont couramment employées. Leur choix dépend du niveau de résolution nécessaire, basse, intermédiaire ou haute, avec parfois la combinaison de différentes méthodes pour lever certaines ambiguïtés de typages.</p> <p>La PCR-SSO (PCR <i>using Sequence Specific Oligonucleotides</i>) consiste en l'utilisation d'amorces localisées dans des séquences conservées encadrant les régions polymorphes. Les produits de PCR sont ensuite hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées. Les trousseaux commerciaux pour le typage HLA par PCR-SSO s'appuient sur la technologie Luminex : des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'amplicons biotinylés sont fixées à la surface de microsphères dont la fluorescence intrinsèque est spécifique de la sonde oligonucléotidique qu'elles portent. Après une étape de révélation en utilisant de la streptavidine couplée à la phycoérythrine, la fluorescence de chaque bille du mélange est mesurée et l'analyse du profil de fluorescence de l'ensemble des billes par un logiciel d'interprétation permet un typage HLA de résolution intermédiaire ou haute selon le type de billes utilisé.</p> <p>La PCR-SSP (PCR <i>using Sequence Specific Primers</i>) est fondée sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'un allèle ou d'un groupe d'allèles en fonction du degré de résolution de l'amorce. La méthode de séquençage, technique la plus résolutive actuellement, peut être utilisée en première intention ou secondairement pour lever des ambiguïtés de typages non résolues par les autres techniques. Le séquençage complet du gène est utilisé pour définir de nouveaux allèles HLA. Le typage HLA par séquençage de la région polymorphe s'initie par une amplification de la région par PCR et purification des amplicons. Ensuite une série de réactions d'élongation est effectuée avec des didésoxynucléotides marqués (ddNTP*) selon la méthode de Sanger. Les séquences de synthèse sont ensuite analysées par électrophorèse capillaire. L'interprétation du séquençage se fait par comparaison avec une banque de données contenant toutes les séquences HLA connues, mise à jour régulièrement. De nouvelles méthodes reposant sur le séquençage à haut débit (<i>Next Generation Sequencing</i>, NGS) commencent à être utilisées.</p>
<b>Type de méthode</b>	Semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitatives.
<b>CIQ</b>	Maison et commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Les performances de ces différentes méthodes de typage varient selon le locus HLA considéré et les trousseaux commerciaux utilisés. Il faut sélectionner la méthode la plus adaptée au niveau de résolution nécessaire.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les problèmes inhérents à toute technique de biologie moléculaire s'appliquent aux typages HLA : qualité de l'extraction de l'ADN, quantité d'ADN suffisante, absence de contamination, etc.

## Synopsis XX

**Principales liaisons et associations HLA-maladies : pertinence pour le diagnostic, la prise en charge ou le suivi**

L'association entre certains allèles HLA et la susceptibilité à des maladies dysimmunitaires, en particulier des maladies auto-immunes, est connue depuis plusieurs décennies. La première association rapportée (1973) est celle de l'allèle HLA-B27 avec la spondylarthrite ankylosante. Depuis, de nombreuses associations ont été décrites avec diverses maladies auto-immunes, mais également avec des syndromes d'hypersensibilité médicamenteuse et avec la résistance ou la réponse à certains agents pathogènes.

La force de l'association est déterminée par le risque relatif (RR ou Odd Ratio) qui correspond au risque qu'un individu porteur de l'allèle en question développe la maladie par rapport à un individu n'exprimant pas cet allèle. Si le risque est supérieur à 1, on parle d'effet prédisposant ; s'il est inférieur à 1, on parle d'effet protecteur.

Dans le cas de l'association HLA-B27/spondylarthrite ankylosante, le risque relatif est très élevé, voisin de 80, c'est-à-dire qu'un sujet B27 aura un risque 80 fois supérieur à un sujet non-B27 de développer cette maladie. Cependant, la plupart des sujets HLA-B27 ne développeront jamais la maladie.

Plus de cent associations HLA-maladies ont été décrites. Citons parmi les plus fréquentes :

- **HLA et maladies auto-immunes :**
  - B27 et spondylarthrite ankylosante ;
  - A29 et rétinopathie de type *birdshot* ;
  - B51 et maladie de Behçet ;
  - Cw6 et psoriasis ;
  - DR3/DQ2-DR4/DQ8 et diabète de type 1 ;
  - DQ2 et maladie cœliaque ;
  - DQB1\*06:02 et narcolepsie ;
  - DRB1\*15:01-DQB1\*06:02 et sclérose en plaques ;
  - l'haplotype DR3-DQ2 est associé à plusieurs maladies auto-immunes : maladie d'Addison, maladie de Basedow, myasthénie, syndrome de Sjögren, etc. ;

- **HLA et maladies infectieuses :**

- B27 et B57 associés à une protection contre la progression de l'infection VIH vers la maladie sida ;
- A29 et B35 associés à une progression rapide ;

- **HLA et réactions médicamenteuses :**

- B\*57:01 et hypersensibilité à l'abacavir ;
- B\*58:01 et hypersensibilité à l'allopurinol ;
- B\*15:02 et hypersensibilité à la carbamazépine.

Dans la majorité des cas, le mécanisme moléculaire précis de ces associations reste mal connu. On pense que certains déterminants antigéniques, ou épitopes, de l'antigène causal (autoantigène, agent infectieux) sont présentés de manière discriminante par certains allèles HLA aux lymphocytes T, favorisant ainsi une réponse immune qui peut être délétère (maladie auto-immune) ou favorable (contrôle de certaines infections).

À ce jour, les seuls exemples d'associations HLA-maladies dans lesquels le mécanisme moléculaire est bien caractérisé sont l'association de HLA-B\*57:01 à hypersensibilité à l'abacavir et l'association de HLA-DQ2 à la susceptibilité à la maladie cœliaque. En effet, 95 % des patients ayant une maladie cœliaque expriment la molécule DQ2 (combinaison des allèles DQA:\*05:01 et DQB1\*02:01) qui n'est présente que chez 20 % des sujets sains (risque relatif environ égal à 30). Le typage HLA apporte une aide lorsque le diagnostic de maladie cœliaque est douteux (symptomatologie clinique incomplète, absence d'anticorps anti-transglutaminase ou anti-gliadine, absence d'atrophie villositaire histologique). Dans les autres pathologies, le typage HLA a peu de valeur en termes de diagnostic, de pronostic ou de prise en charge, et ne doit donc pas être réalisé en routine. Les maladies auto-immunes sont d'une manière générale des maladies multifactorielles, impliquant des facteurs environnementaux et génétiques, parmi lesquels les gènes HLA ne contribuent que pour une part à la susceptibilité.

## Fiche 17.3

**Recherche de l'allèle HLA-B27****Signification biologique du paramètre**

La présence de l'allèle HLA-B27 est associée à un risque accru de développer certaines pathologies rhumatismales inflammatoires, en premier lieu la spondylarthrite ankylosante, mais aussi le rhumatisme psoriasique et le syndrome de Reiter. L'allèle HLA-B27 est retrouvé chez 90 % des patients d'origine caucasienne atteints de spondylarthrite ankylosante, alors qu'il n'est présent que chez 8 % des individus sains. Il faut noter cependant que plus de 95 % des individus HLA-B27 ne développeront jamais de spondylarthrite ankylosante. Les mécanismes précis de cette association entre HLA-B27 et prédisposition à la spondylarthrite ankylosante ne sont toujours pas connus.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

La recherche de HLA-B27 peut être réalisée :

- en cytométrie en flux : présence ou absence de l'antigène HLA-B27 à la surface des lymphocytes du sang périphérique déterminée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-B27 ;

- en biologie moléculaire : présence ou absence de l'allèle HLA-B27 déterminée le plus souvent par PCR-SSP *2-digits*.

Le diagnostic de spondylarthrite ankylosante repose sur des signes cliniques et radiologiques. La présence de l'allèle HLA-B27 peut être une aide au diagnostic quand la symptomatologie clinique et radiologique est douteuse.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

La recherche de HLA-B27 ne doit pas être systématique. Cet examen n'apporte rien quand le diagnostic clinique est évident et n'a pas de valeur pronostique en termes de sévérité ou d'évolution de la maladie. En aucun cas la présence de HLA-B27 ne permet à elle seule de poser le diagnostic de spondylarthrite ankylosante, ni de prédire le risque de survenue de la maladie chez un sujet sain. Une fois réalisé, il ne doit pas être répété. Enfin, l'absence de HLA-B27 n'exclut pas le diagnostic de spondylarthrite ankylosante.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur héparine ou EDTA pour le typage en cytométrie en flux, sur EDTA ou ACD pour le typage en biologie moléculaire.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Acheminement à température ambiante dans les 48 heures pour le typage en cytométrie de flux ; pas de délai pour le typage en biologie moléculaire.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation à température ambiante avant analyse.
<b>Principe méthodologique</b>	L'approche par biologie moléculaire repose sur l'extraction de l'ADN puis une étape de PCR spécifique de l'allèle HLA-B27 à l'aide d'un couple d'amorces amplifiant une séquence unique à cet allèle. Le typage HLA-B27 par cytométrie en flux comprend une première étape d'incubation du sang total ou des lymphocytes circulants isolés en présence d'un anticorps monoclonal anti-B27 couplé à un fluorochrome puis la détection en cytométrie des cellules positives (pourcentage et intensité de fluorescence).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisée pour la distribution des réactifs.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Contrôle positif (cellules ou ADN d'un individu HLA-B27).
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Excellente performance du test en biologie moléculaire qui est la technique de référence.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Un résultat faiblement positif en cytométrie en flux nécessite un contrôle en biologie moléculaire.

## Fiche 17.4

## Recherche de l'allèle HLA-B\*57:01 préalable à la prescription d'abacavir

### Signification biologique du paramètre

L'abacavir, inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, est recommandé comme traitement de première ligne de l'infection à VIH. Cette molécule est responsable de réactions d'hypersensibilité retardée médiées par les lymphocytes T chez environ 4 % des patients traités. Cette réaction survient préférentiellement à l'initiation du traitement et peut mettre en jeu le pronostic vital en cas de retrait tardif de la molécule ou de sa réintroduction. L'allèle HLA-B\*57:01 est associé à un risque majoré de développement d'une réaction d'hypersensibilité retardée à l'abacavir. Sa

prévalence est de 5 à 7 % dans l'Europe de l'Ouest, de moins de 1 % en Afrique subsaharienne.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Cet acte est indiqué chez les patients infectés par le VIH devant recevoir un traitement incluant de l'abacavir.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Ce test doit être réalisé avant la première prescription d'abacavir et ne doit pas être répété.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang sur EDTA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Le sang sur EDTA ou l'ADN extrait du prélèvement sanguin peuvent être conservés congelés ou réfrigérés pour certaines extractions d'ADN.
<b>Principe méthodologique</b>	Plusieurs techniques de biologie moléculaire sont disponibles pour la détection de l'allèle HLA-B*57:01. Les approches de basse ou moyenne résolution permettent de conclure à l'appartenance ou non au groupe d'allèles HLA-B*57 mais sans déterminer la présence ou non de l'allèle HLA-B*57:01 qui doit être recherché dans un second temps si le sujet est HLA-B*57. Des troupes commerciales PCR-SSP B*57:01 permettent aujourd'hui une stratégie de typage en un temps avec détection directe de l'allèle HLA-B*57:01. Le séquençage permet également une détection allélique directe. Cet examen relève de la législation relative à l'examen des caractéristiques génétiques, l'identification génétique et la recherche génétique (articles L. 1131-1 à L. 1131-7 du Code de la santé publique) : seuls les laboratoires autorisés et les praticiens agréés sont habilités à exécuter cet acte.
<b>Type de méthode</b>	Semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Très satisfaisante : risque relatif > 1 000 et valeur prédictive négative de B*57 pour la réaction d'hypersensibilité à 100 %.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les problèmes inhérents à toute technique de biologie moléculaire s'appliquent aux typages HLA : qualité de l'extraction de l'ADN, quantité d'ADN suffisante, absence de contamination...

## Bibliographie du chapitre 17

FICHE 17.1 – Typage HLA de classe I ou II en sérologie par microlymphocytotoxicité

Bodmer J, et al. Leucocyte antigens in man : a comparison of lymphocytotoxic and agglutination assays for their detection. *Nature* 1966 ; 210 : 28–31.

Ferrone S, et al. The microlymphocytotoxicity test for HLA-A, B, C and HLA-DR typing. In : *Immunoassays : Clinical laboratory Techniques for the 1980s*. NewYork : Alan R Liss Inc; 1980. p. 255–85.

Vartdal F, et al. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation-a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* 1986 ; 28 : 301–12.

FICHE 17.2 – Typage HLA de classe I ou II en biologie moléculaire

Cesbron-Gautier A, et al. Technologie Luminex : application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004 ; 62 : 93–8.

Dormoy A, et al. Mono-allelic amplification of exons 2–4 using allele group-specific primers for sequence-based typing (SBT) of the HLA-A, -B and -C genes : preparation and validation of ready-to-use pre-SBT mini-kits. *Tissue Antigens* 2003 ; 62 : 201–16.

Olerup O, et al. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours : an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992 ; 39 : 225–35.

FICHE 17.3 – Recherche de l'allèle HLA-B27

Colombani J. HLA, fonctions immunitaires et applications médicales. Paris : John Libbey Eurotext; 1993.

FICHE 17.4 – Recherche de l'allèle HLA-B\*57:01 préalable à la prescription d'abacavir

Hetherington S. Understanding drug hypersensitivity : what to look for when prescribing abacavir. *AIDS* 2001 ; 11 : 620–2.

Illing P, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 2012 ; 486 : 554–8.

Phillips E, et al. Clinical and immunogenetic correlates of abacavir hypersensitivity. *AIDS* 2005 ; 19 : 979–81.

Saag M, et al. High sensitivity of human leukocyte antigen-B\*5701 as a marker of immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients. *Clin Infect Dis* 2008 ; 46 : 1111–8.

# Chapitre 18

## **Dépistage et identification des anticorps anti-HLA**

## Fiche 18.1

### Dépistage d'anticorps anti-lymphocytes T par microlymphocytotoxicité

#### Signification biologique du paramètre

Le dépistage d'anticorps anti-lymphocytes T par microlymphocytotoxicité est utilisé pour détecter la présence dans le sérum d'anticorps anti-HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C). Le développement d'anticorps dirigés contre des molécules HLA étrangères ou allogéniques (anticorps anti-HLA ou alloanticorps) peut se produire après une grossesse, des transfusions sanguines, une transplantation avec un donneur non HLA identique. En transplantation d'organes, les anticorps anti-HLA préexistants peuvent déclencher un rejet hyperaigu. Leur apparition au décours de la greffe peut être responsable d'un rejet aigu humoral et contribue à la dysfonction chronique du greffon (rejet chronique). Les anticorps anti-HLA peuvent aussi être responsables de réactions post-transfusionnelles allant jusqu'au TRALI (syndrome de détresse respiratoire aiguë) mais aussi d'états réfractaires aux concentrés plaquettaires.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La méthode de référence pour la détection des anticorps anti-HLA est le test de microlympho-

cytototoxicité, ou cytotoxicité dépendant du complément (CDC). Il est cependant peu sensible et non spécifique du HLA car il peut détecter à la surface des lymphocytes T des antigènes non HLA. En revanche, il permet la détection d'anticorps d'isotype IgG et/ou IgM et atteste du caractère cytotoxique des anticorps détectés. Depuis l'avènement de techniques plus sensibles, les principales indications de ce test se sont restreintes. De même, la recherche d'anticorps anti-lymphocytes B par microlymphocytotoxicité, initialement développée pour mettre en évidence les anticorps anti-HLA de classe II, est une technique aujourd'hui pratiquement abandonnée avec le développement des techniques sensibles.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Dans le cadre du suivi immunologique prégreffe d'un patient en attente d'une greffe rénale, le test est préconisé une fois par an chez le futur receveur, principalement pour la recherche d'anticorps d'isotype IgM. Il conserve son indication dans le cadre des bilans d'accidents transfusionnels.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le point essentiel est le respect des règles de fréquence de prélèvements du patient selon son statut initial à l'inscription sur liste d'attente (non immunisé, immunisé ou hyper-immunisé) ou lors de la survenue d'événements immunisants.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré si moins d'une semaine ; au-delà, aliquotage et stockage congelé. En transplantation, dans le cadre du suivi immunologique prégreffe et post-greffe, le laboratoire d'histocompatibilité en charge du receveur a la responsabilité de la conservation prolongée des sérums des receveurs.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>Tous les lymphocytes expriment les antigènes HLA-A, HLA-B, HLA-C de classe I. En l'absence de stimulation, seuls les lymphocytes B expriment les antigènes HLA de classe II.</p> <p>La recherche d'anticorps anti-lymphocytes T est réalisée sur un panel d'environ 30 suspensions de lymphocytes totaux ou T issus de donneurs dont le typage HLA est connu et qui ont été sélectionnés pour que la distribution des antigènes HLA soit représentative de la population régionale.</p> <p>Le sérum du patient ainsi que du complément de lapin sont déposés dans les micropuits d'une plaque de Terasaki contenant chacun une suspension lymphocytaire différente. Après incubation à température ambiante, si le sérum contient des anticorps anti-HLA cytotoxiques reconnaissant les spécificités HLA exprimées par les lymphocytes, les lymphocytes de ce puits sont lysés en présence de complément. La lyse est mise en évidence à l'aide d'un colorant vital (éosine ou acridine-orange). Pour chaque puits, la proportion de lymphocytes lysés (colorés) et non lysés est déterminée à l'aide d'un microscope à contraste de phase inverse (éosine) ou à l'aide d'un microscope à fluorescence inverse (acridine-orange). Pour chaque puits, la proportion de lymphocytes lysés est évaluée par un score (de 2 à 8, le score 1 définissant l'absence de lyse).</p> <p>Pour distinguer une réactivité du sérum liée à des anticorps d'isotype IgG et/ou IgM, la même technique est réalisée en parallèle en présence de dithiothréitol (DTT), agent réducteur de ponts disulfures entraînant une dépolymérisation des IgM. Si la positivité du sérum disparaît en présence de DTT, ceci indique une réactivité liée à des IgM. Il peut s'agir d'une immunisation récente ou d'autoanticorps.</p> <p>Au total, le résultat communiqué est le pourcentage de puits contenant des cellules lysées au sein du panel, ou PRA (<i>Panel Reactive Antibody</i>). Exemple : 6 puits avec un score &gt; à 4/30 puits : PRA à 20 %.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisée pour la lecture au microscope inverse.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison. Un témoin négatif permet d'évaluer la viabilité de base des lymphocytes qui doit être supérieure à 90 %. Un témoin positif permet de contrôler l'activité du complément qui doit aboutir à plus de 80 % de lymphocytes lysés.
<b>EEQ</b>	Oui
<b>Performances du test</b>	Le dépistage d'anticorps anti-lymphocytes T par microlymphocytotoxicité est un test peu sensible mais attestant du caractère cytotoxique des anticorps détectés. En termes de spécificité, il détecte des anticorps anti-HLA mais aussi non HLA.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>Les laboratoires d'histocompatibilité utilisent soit des suspensions de lymphocytes de donneurs sélectionnés qu'ils préparent (technique maison) ou des plaques commercialisées, congelées, où les différentes suspensions de lymphocytes sont pré-réparties dans les micropuits. Ces réactifs sont fragiles et posent le problème de la représentativité des allèles HLA du panel utilisé dans un bassin de population et entre différents bassins de population. Ainsi, respectivement, le test peut être mis en défaut si le sérum contient des anticorps anti-HLA spécifiques d'antigènes HLA non représentés dans le panel (origine ethnique du patient à tester) ou si la fréquence d'antigènes courants est trop différente entre des panels préparés dans deux laboratoires différents, par exemple.</p> <p>Des résultats faussement positifs apparaissent après l'administration de sérum antilymphocytaire au patient pour quelques semaines à quelques mois.</p>

## Fiche 18.2

### Dépistage des anticorps anti-HLA de classe I et II par technique sensible

#### Signification biologique du paramètre

L'apparition d'anticorps dirigés contre des molécules HLA allogéniques (alloanticorps) peut se produire après une grossesse, une transfusion sanguine (culot globulaire ou plaquettes), une transplantation avec un donneur non HLA identique. Le dépistage des anticorps anti-HLA par technique sensible est utilisé pour détecter la présence dans le sérum d'un sujet d'anticorps anti-HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) et de classe II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) même à taux faible du fait d'une immunisation ancienne par exemple.

En transplantation d'organes, les anticorps anti-HLA préexistants peuvent déclencher un rejet hyperaigu. Leur apparition après la greffe peut être responsable d'un rejet aigu humoral et contribue à la dysfonction chronique du greffon (rejet chronique). Les anticorps anti-HLA peuvent aussi être responsables de réactions post-transfusionnelles allant jusqu'au syndrome de détresse respiratoire post-transfusionnel ou TRALI (*Transfusion-Related Acute Lung Injury*) mais aussi d'états réfractaires aux concentrés plaquettaires.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La détection de ces anticorps par la méthode de référence, le test de microlymphocytotoxicité (LCT) ou cytotoxicité complément-dépendante (CDC), est peu sensible et manque de spécificité.

Le dépistage des anticorps anti-HLA par technique sensible est fondé sur l'utilisation d'antigènes HLA purifiés fixés sur un support solide. Par leur sensibilité, ces nouvelles approches ont révolutionné le dépistage des alloanticorps anti-HLA de classe I et de classe II.

En transplantation, le dépistage des anticorps anti-HLA par technique sensible est prescrit systématiquement en prégreffe chez tous les receveurs en attente d'une transplantation, selon une fréquence déterminée par le statut d'immunisation (futur receveur non immunisé sans anticorps anti-HLA ou receveur immunisé, voire hyperimmunisé). En post-greffe, le dépistage recherche une immunisation vis-à-vis du greffon transplanté. Il est indiqué en cas de rejet ou d'événements immunisants (arrêt des immunosuppresseurs, détransplantation, transfusion). L'Agence de la biomédecine fixe la fréquence de réalisation de ce test pour les différents types de greffe. En transfusion, ce dépistage peut être prescrit notamment chez les patients réfractaires aux concentrés plaquettaires ou pour le diagnostic du TRALI.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Le dépistage par technique sensible des anticorps anti-HLA est aujourd'hui réalisé en première intention en lieu et place de la recherche des anticorps anti-HLA par la technique en microlymphocytotoxicité. Selon les cas, un dépistage positif sera suivi ou non de l'identification précise des antigènes HLA reconnus par les anticorps.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le point essentiel est le respect des règles de fréquence de prélèvements du patient selon son statut initial à l'inscription sur liste d'attente (non immunisé, immunisé ou hyper-immunisé) ou lors de la survenue d'événements immunisants.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré si moins d'une semaine ; au-delà, aliquotage et stockage congelé. En transplantation, dans le cadre du suivi immunologique prégreffe et post-greffe, le laboratoire d'histocompatibilité en charge du receveur a la responsabilité de la conservation prolongée des sérums des receveurs.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>La détection sensible des anticorps anti-HLA est essentiellement réalisée selon la technologie multiplex par fluorimétrie en flux (ALBIA). Des trousse commerciales, adaptées à un automate couplé à un logiciel spécifique d'interprétation sont utilisées.</p> <p>Le principe méthodologique repose sur l'utilisation d'antigènes HLA de classe I et II fixés à la surface de microsphères différentes, ayant chacune une fluorescence définie. Le sérum du patient (ou le sérum témoin négatif) est incubé avec le mélange de microsphères. Les anticorps non fixés sont éliminés par lavage. Un anticorps anti-IgG humaine, marqué par le fluorochrome phycoérythrine, est ajouté et se fixe le cas échéant sur les anticorps anti-HLA du patient ayant reconnu les antigènes HLA de classe I et/ou II fixés sur les microsphères.</p> <p>L'excès d'anticorps anti-IgG est éliminé par lavage. La suspension de billes est analysée par fluorimétrie en flux. Les différentes catégories de billes sont identifiées par leur fluorescence intrinsèque et pour chacune d'entre elles, la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de la phycoérythrine est calculée pour les billes comptées. Un logiciel d'interprétation permet de conclure quant à la présence ou non d'anticorps anti-HLA dans le sérum du patient.</p> <p>Ces tests mettent en évidence des anticorps qui fixent le complément ou non et ne renseignent pas sur leur pouvoir cytotoxique.</p> <p>L'interprétation des résultats requiert la connaissance du dossier immunologique du patient et le suivi dans le même laboratoire d'histocompatibilité.</p> <p>Des tests ELISA et des tests sur micropuces sont disponibles.</p>
<b>Type de méthode</b>	Semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative extrapolée à partir de données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Oui.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Test très sensible.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>Une étape d'adsorption du sérum avec un réactif fournisseur est parfois nécessaire en cas de fluorescence anormalement élevée de la bille contrôle négative (dépourvue d'antigènes HLA).</p> <p>Un effet pro-zone peut être responsable de sous-estimation du niveau d'anticorps voire de faux négatifs, suite à l'activation du complément par les complexes antigènes-anticorps entraînant l'incapacité de l'anti-IgG humaine de se lier à l'anticorps anti-HLA. Les IgM peuvent aussi entrer en compétition avec les IgG anti-HLA. Les antigènes HLA fixés sur leur support sont partiellement dénaturés et le démasquage d'épitopes non pertinents peut être responsable de résultats faussement positifs.</p> <p>La reproductibilité inter-laboratoires pour les taux d'anticorps faibles (<i>a priori</i> de MFI basse) est problématique.</p>

## Fiche 18.3

### Identification des spécificités des anticorps anti-HLA par technique sensible

#### Signification biologique du paramètre

L'apparition d'anticorps dirigés contre des molécules HLA allogéniques (alloanticorps) peut se produire après une grossesse, une transfusion sanguine (culot globulaire ou plaquettes), une transplantation avec un donneur non HLA identique. Le dépistage des anticorps anti-HLA par technique sensible est utilisé pour détecter la présence dans le sérum d'un sujet d'anticorps anti-HLA de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) et de classe II (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) même à taux faible du fait d'une immunisation ancienne par exemple.

En transplantation d'organes, les anticorps anti-HLA préexistants peuvent déclencher un rejet hyperaigu. Leur apparition après la greffe peut être responsable d'un rejet aigu humoral et contribue à la dysfonction chronique du greffon (rejet chronique). Les anticorps anti-HLA peuvent aussi être responsables de réactions post-transfusionnelles allant jusqu'au syndrome de détresse respiratoire post-transfusionnel ou TRALI (*Transfusion-Related Acute Lung Injury*) mais aussi d'états réfractaires aux concentrés plaquettaires.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

En prégreffe, l'identification des antigènes HLA reconnus par ces anticorps est indispensable pour écarter les propositions de greffons porteurs de ces antigènes HLA. En post-greffe, l'identification des antigènes HLA du greffon spécifiquement reconnus par ces anticorps (*Donor Specific Antigen*,

DSA) est un élément clé du diagnostic du rejet humoral et du suivi de l'allo-immunisation post-greffe.

Chez tous les futurs receveurs immunisés en attente d'une transplantation d'organe, l'identification de toutes les spécificités antigéniques reconnues par les anticorps anti-HLA doit être réalisée par technique sensible sur les sérums historiques les plus pertinents (forte positivité et/ou modification du profil de réactivité en dépistage, circonstances d'immunisation). Une fois inscrit sur liste d'attente, le suivi prégreffe de l'allo-immunisation du futur receveur est réalisé selon une fréquence fixée par l'Agence de la biomédecine, variable selon le type de greffe. En post-greffe d'organes, ce test a pour objectif d'identifier l'apparition de DSA.

En allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, l'identification des spécificités des anticorps anti-HLA est préconisée pour les greffes réalisées avec un donneur haplo-identique ou des unités de sang placentaire.

En transfusion, ce dépistage peut être prescrit notamment chez les patients réfractaires aux concentrés plaquettaires ou pour le diagnostic du TRALI.

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Cette analyse est prescrite chez les patients dont l'allo-immunisation antérieure a été déterminée au préalable par un test de dépistage sensible. Il peut être répété pour caractériser les modifications qualitatives et quantitatives de l'allo-immunisation.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le point essentiel est le respect des règles de fréquence de prélèvements du patient selon son statut initial à l'inscription sur liste d'attente (non immunisé, immunisé ou hyper-immunisé) ou lors de la survenue d'événements immunisants.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Aucune.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré si moins d'une semaine ; au-delà, aliquotage et stockage congelé. En transplantation, dans le cadre du suivi immunologique prégreffe et post-greffe, le laboratoire d'histocompatibilité en charge du receveur a la responsabilité de la conservation prolongée des sérums des receveurs.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>L'identification par technique sensible des anticorps anti-HLA est essentiellement réalisée selon la technologie multiplex par fluorimétrie en flux (ALBIA). Le principe méthodologique repose sur l'utilisation d'antigènes HLA de classe I ou II fixés à la surface de microsphères différentes, ayant chacune une fluorescence intrinsèque définie. Les trousses commerciales où chaque bille est recouverte par un seul antigène HLA de classe I ou II sont privilégiées pour identifier finement les spécificités antigéniques des anticorps anti-HLA présents dans un sérum. Le sérum du patient est incubé avec le mélange de microsphères. Après élimination des anticorps non fixés par lavage, la fixation d'anticorps anti-HLA sur les billes est révélée par l'ajout d'un anticorps anti-IgG humaine, marqué par le fluorochrome phycoérythrine. La suspension de billes est analysée par fluorimétrie en flux. Les différentes catégories de billes sont identifiées par leur fluorescence intrinsèque et pour chacune bille, la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de la phycoérythrine est calculée pour les billes comptées. Selon les seuils de MFI fixés, un logiciel d'interprétation permet d'obtenir le profil d'allo-immunisation du sérum avec le classement des anticorps anti-HLA selon leur valeur de MFI. Ces tests mettent en évidence des anticorps qui fixent le complément ou non et ne renseignent pas sur leur pouvoir cytotoxique.</p> <p>L'interprétation des résultats requiert la connaissance du dossier immunologique du patient et le suivi dans le même laboratoire d'histocompatibilité.</p>
<b>Type de méthode</b>	Semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative extrapolée à partir de données quantifiables.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Test très sensible.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	<p>Un effet pro-zone peut être responsable de faux négatifs (cf. Fiche 18.3).</p> <p>Les antigènes HLA fixés sur leur support sont partiellement dénaturés et le démasquage d'épitopes non pertinents peut être responsable de résultats faussement positifs.</p> <p>La reproductibilité inter-laboratoires pour les taux d'anticorps faibles (MFI basse) est problématique.</p>

## Bibliographie du chapitre 18

FICHE 18.1 – Dépistage d'anticorps anti-lymphocytes T par microlymphocytotoxicité

Colombani J, Hors J. Technique de recherche des anticorps lymphocytotoxiques et détermination des groupes tissulaires HLA. In : Techniques en hématologie. Paris : Flammarion Médecine-Sciences; 1972. p. 251–6.

Terasaki P, et al. Presensitization and kidney transplant failures. *Postgrad Med J* 1971; 47 : 89–100.

EFI Standards for histocompatibility and immunogenetics. Version 6.1.2013, section F.

FICHE 18.2 – Dépistage des anticorps anti-HLA de classe I et II par technique sensible

Colombo M, et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening, evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72 : 465–71.

Reed E, et al. Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the

detection of antibodies to HLA. *Am J Transplant* 2013; 13 : 1859–70.

EFI Standards for histocompatibility and immunogenetics. Version 6.1.2013, section F.

FICHE 18.3 – Identification des spécificités des anticorps anti-HLA par technique sensible

Giannoli C, et al. HLA and transfusion : new approaches with Luminex™ technology. *Transfus Clin Biol* 2011; 18 : 218–23.

O'Leary JG, et al. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *Am J Transplant* 2011; 11 : 1868–76.

Pei R, et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003; 75 : 43–9.

EFI Standards for histocompatibility and immunogenetics. Version 6.1.2013, section F.

# Chapitre 19

## **Épreuves de compatibilité tissulaire**

## Fiche 19.1

### **Crossmatch lymphocytaire par microlymphocytotoxicité ou cytométrie en flux**

#### **Signification biologique du paramètre**

En transplantation d'organe, la préexistence chez le receveur d'anticorps anti-HLA spécifiques des molécules HLA du donneur est susceptible d'entraîner un rejet hyperaigu d'allogreffe. La préexistence d'anticorps dirigés contre des molécules HLA étrangères (allogéniques) peut résulter d'une grossesse, d'une transfusion sanguine ou d'une première transplantation avec un donneur non HLA-identique. Ces anticorps anti-HLA peuvent conduire à la destruction du greffon dans les heures suivant la greffe par un mécanisme de cytotoxicité dépendant des anticorps.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Avant l'avènement des techniques sensibles de détection des alloanticorps, le crossmatch lymphocytaire par microlymphocytotoxicité constituait l'épreuve de compatibilité ultime et toute transplantation était contre-indiquée lorsque n'importe lequel des sérums historiques du receveur donnait une réaction positive en présence des lymphocytes ganglionnaires ou spléniques du donneur poten-

tiel. Cette condition est toujours nécessaire mais n'est plus suffisante et les greffons exprimant des antigènes HLA vis-à-vis desquels des anticorps anti-HLA ont été identifiés dans les sérums historiques du receveur sont aussi écartés même s'ils ne donnent pas une réaction positive de cytotoxicité. Le crossmatch en cytométrie en flux, plus complexe à mettre en œuvre, mais plus sensible, a le même objectif. Il est requis pour une transplantation rénale à donneur vivant.

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Le crossmatch lymphocytaire par microlymphocytotoxicité est une épreuve de compatibilité ultime réalisée prospectivement en urgence en prégreffe pour la majorité des organes greffés. Il est fait en post-greffe de manière rétrospective dans certaines situations particulières, comme la greffe cardiaque et pulmonaire ou chez des patients non immunisés dans le cadre de protocoles après crossmatch virtuel validé. Le crossmatch en cytométrie en flux est très fortement recommandé en prégreffe rénale avec donneur vivant.

<b>Nature du prélèvement</b>	Deux prélèvements différents sont nécessaires : d'une part les sérums historiques du receveur dont un sérum de moins de 3 mois ou du jour de la greffe et, d'autre part, des ganglions et/ou un fragment de rate du donneur pour en extraire les lymphocytes. Un prélèvement de sang sur EDTA ou héparine pour le donneur est utilisé pour le cas particulier d'un crossmatch avec donneur vivant.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Les ganglions et/ou la rate sont placés dans un milieu de conservation et transportés réfrigérés. Ils ne doivent en aucun cas être fixés.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Les ganglions et/ou la rate du donneur sont expédiés en urgence par le centre autorisé au prélèvement d'organes pour acheminement au service de transplantation du receveur présélectionné, qui les transmet au laboratoire.
<b>Mode de conservation</b>	Les sérums historiques du receveur sont préalablement aliquotés pour éviter des décongelations itératives et doivent être conservés congelés par le laboratoire d'histocompatibilité responsable du suivi immunologique du receveur. Le reliquat de cellules de ganglion ou rate du donneur non utilisées pour le crossmatch est conservé congelé dans l'azote liquide à des fins de crossmatch rétrospectif post-greffe.
<b>Principe méthodologique</b>	La positivité d'un crossmatch est une contre-indication à la greffe quand elle est déclenchée par des anticorps anti-HLA d'isotype IgG. Pour distinguer une positivité provoquée par des anticorps d'isotype IgM, les réactions de crossmatch en microlymphocytotoxicité sont réalisées en parallèle, en présence ou non de dithiothréitol (DTT) pour éliminer les anticorps d'isotype IgM. Pour le crossmatch en cytométrie en flux, des fragments F(ab') <sub>2</sub> spécifiques de fragment Fc des IgG humaines couplés à un fluorochrome sont utilisés de manière à ne révéler que les anticorps d'isotype IgG. Pour le crossmatch lymphocytaire par microlymphocytotoxicité, les lymphocytes totaux et B du donneur sont isolés des ganglions, de la rate ou du sang puis mis à incuber dans les micropuits d'une plaque de Terasaki avec les sérums du receveur en présence de complément de lapin. Après incubation à température ambiante, si un ou plusieurs sérums contiennent des anticorps anti-HLA cytotoxiques reconnaissant les spécificités HLA exprimées par les lymphocytes T et/ou B du donneur, les lymphocytes de ce puits sont lysés. La lyse est mise en évidence à l'aide d'un colorant vital (éosine ou acridine-orange). Pour chaque puits, la proportion de lymphocytes lysés (colorés) et non lysés est déterminée à l'aide d'un microscope à contraste de phase inverse (éosine) ou à l'aide d'un microscope à fluorescence inverse (acridine-orange). Le crossmatch par cytométrie en flux est réalisé sur cellules mononucléées préalablement isolées des ganglions, de la rate ou du sang total ou directement sur sang total. Son principe repose sur la caractérisation des cellules T et B du donneur par un immunomarquage CD3 et CD19 et la détermination au sein de chacune de ces deux sous-populations de l'intensité moyenne de fluorescence du marquage par le fragment F(ab') <sub>2</sub> anti-IgG humaines, qui sera interprétée par rapport à un sérum témoin négatif (dépourvu d'alloanticorps anti-lymphocytes). Quelle que soit la technique de crossmatch utilisée pour évaluer la spécificité de l'alloreconnaissance, un crossmatch autologue ou auto-crossmatch est réalisé de façon systématique avec les lymphocytes du receveur incubés avec ses propres sérums.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisée au niveau de la lecture pour le crossmatch en cytométrie en flux.
<b>Type de mesure</b>	Qualitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Le crossmatch en cytométrie en flux est une épreuve de compatibilité tissulaire plus sensible que la réaction de crossmatch en microlymphocytotoxicité.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	L'obtention et la sélection des sérums historiques du receveur les plus pertinents sont critiques pour la signification biologique du crossmatch quelle que soit la méthodologie employée. Si le suivi immunologique du receveur et l'identification des anticorps anti-HLA par des techniques sensibles suivent bien les recommandations en vigueur (Agence de la biomédecine), les réactions de crossmatch doivent être négatives (stratégie de crossmatch virtuel préalable au crossmatch réel). Ces deux tests sont réservés à des laboratoires d'histocompatibilité.

## Bibliographie du chapitre 19

FICHE 19.1 – Crossmatch lymphocytaire par microlymphocytotoxicité ou cytométrie en flux

Iwaki Y, et al. Crossmatching with B and T cells and flow cytometry. *Clin Transpl* 1986; 277–84.

Kurihara K, et al. Impact of flow cytometry crossmatch B-cell positivity on living renal transplantation. *Transplant Proc* 2013; 45 : 2903–6.

Patel R, et al. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280 : 735–9.

Rebidou J-M, et al. Flow cytometric evaluation of pregnancy-induced anti-HLA immunization and blood transfusion-induced reactivation. *Transplantation* 2002; 74 : 537–40.

# Chapitre 20

## **Étude du chimérisme**

## Fiche 20.1

# Étude du chimérisme post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

### Signification biologique du paramètre

Chez un patient ayant reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), l'étude du chimérisme, réalisée en analysant les marqueurs génétiques informatifs propres au donneur et au receveur, a pour objectif de déterminer et de quantifier au sein d'un échantillon (sang, moelle, cellules triées) les cellules donneur et/ou receveur. Le chimérisme est dit :

- «total» lorsque seules les cellules du donneur sont détectées chez le receveur;
- «partiel» ou «mixte» lorsque des cellules du donneur et du receveur sont présentes de façon concomitante au sein de l'échantillon étudié;
- «absent» en cas d'absence totale de cellules du donneur.

Son intérêt est devenu majeur dans les allogreffes à conditionnement réduit où la faible myélotoxicité conduit à une cohabitation initiale entre l'hématopoïèse du donneur et du receveur.

### Objectifs de l'analyse et principales indications

Le chimérisme après allogreffe de CSH permet d'évaluer la prise de greffe. L'évolution du

chimérisme post-greffe est le témoin indirect de l'effet allogénique d'un greffon et le suivi de son évolution permet de prédire des événements comme la rechute ou le rejet de greffe afin de mettre en œuvre rapidement un traitement adapté. Un chimérisme mixte peut indiquer la réapparition de cellules tumorales. Il peut aussi être observé dans le suivi précoce post-greffe lors d'une allogreffe à conditionnement atténué ou d'intensité réduite.

### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

L'étude du chimérisme post-greffe est un examen de première intention réalisée de manière rapprochée dans les premiers mois post-greffe (J30, J60, J90, J180) pour rechercher la prise de greffe ou le rejet de greffe puis de façon plus espacée pour détecter la rechute et évaluer la maladie résiduelle en l'absence de marqueurs hématologiques classiques.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sang ou moelle prélevés sur EDTA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Dans le cas d'une étude du chimérisme sur cellules triées, se rapprocher du laboratoire pour optimiser l'arrivée du prélèvement et le tri cellulaire (séparation dans les 8 heures suivant le prélèvement pour le tri CD34, dans les 24 heures pour les autres tris).
<b>Mode de conservation</b>	ADN extrait congelé.
<b>Principe méthodologique</b>	<p>L'analyse des marqueurs génétiques des systèmes de <i>Short Tandem Repeats</i> (STR, ou microsatellites) et l'analyse des marqueurs de type <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) sont les deux techniques couramment utilisées par les laboratoires accrédités.</p> <p>Quelle que soit la méthode, l'analyse du chimérisme requiert une première étape de génotypage ou détermination en prégreffe des marqueurs génétiques spécifiques du donneur et du receveur les plus informatifs et une deuxième étape de quantification spécifique des marqueurs sélectionnés.</p> <p>La méthode PCR-STR consiste à séparer les amplicons obtenus selon leur taille par électrophorèse capillaire et à calculer par comparaison les aires des pics spécifiques du donneur ou du receveur.</p> <p>L'analyse des SNP par <i>Real Time Quantitative</i> PCR (RQ-PCR) repose sur le procédé TAQMAN® où une sonde fluorescente clivée par l'enzyme Taq polymérase émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'amplicons générés.</p>
<b>Type de méthode</b>	Manuelle semi-automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	<p>Ces deux techniques sont fiables et reproductibles.</p> <p>L'analyse des SNP par RQ-PCR requiert une plus grande quantité d'ADN que la méthode PCR-STR. Celle-ci permet une étude post-greffe précoce sur un prélèvement pauvre en cellules mais elle est moins sensible (1–5 % d'ADN receveur) que la méthode RQ-PCR (0,2 % d'ADN receveur) qui permet de détecter des fractions cellulaires peu représentées.</p>
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	En cas d'absence de tout système informatif discriminant entre le receveur et son donneur, l'étude du chimérisme n'est pas réalisable. En période post-greffe précoce, l'aplasie chez le receveur peut être responsable d'un défaut de quantification des différentes populations sanguines.

## Bibliographie du chapitre 20

FICHE 20.1 – Étude du chimérisme post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Alizadeh M, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; 99 : 4618–25.

Borhäuser M, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34 + peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2009; 94 : 1613–7.

Mohty M, et al. Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007; 92 : 1004–6.

Thiede C, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescent detection. *Bone Marrow Transplantation* 1999; 23 : 1055–60.

Waterhouse M, et al. An internal validation approach and quality control on hematopoietic chimerism testing after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51 : 363–9.

# Chapitre 21

## **Surveillance d'un traitement par biomédicaments**

## Synopsis XXI

**Des anticorps monoclonaux aux anticorps recombinants**

Du fait de leur immunogénicité, les anticorps monoclonaux thérapeutiques murins ont progressivement été remplacés par des anticorps chimères dont les domaines constants puis les régions charpentes des domaines variables murins ont été substitués par des structures humaines. Cependant, bien que la diminution des parties murines ait nettement fait diminuer la réponse immunologique de l'hôte face à ces biomédicaments, l'idiotype garde un potentiel d'immunogénicité.

**Classification des anticorps monoclonaux murins et recombinants thérapeutiques***Anticorps thérapeutiques neutralisants*

La fixation de l'anticorps se fait sur un site critique de la fonction de la cible. Par exemple :

- anti-C5 (éculizumab) ;
- anti-TNF (infliximab, adalimumab, certolizumab pegol).

*Anticorps thérapeutiques antagonistes*

L'anticorps se lie spécifiquement à un récepteur membranaire ou à son ligand, induisant le blocage de la liaison physiologique ligand-récepteur. Par exemple :

- anti-récepteur/cytokine ou facteur de croissance : anti-EGFR (cetuximab) ;
- anticorps anti-intégrines : anti-VLA-4 (natalizumab).

*Anticorps thérapeutiques cytolytiques*

L'anticorps reconnaît par son domaine variable (partie Fab) une protéine membranaire pouvant entraîner un effet cytolytique par la fixation de son domaine constant (partie Fc) à un récepteur au fragment Fc des immunoglobulines présent sur les cellules cytotoxiques (les cellules NK, macrophages, polynucléaires). Par exemple :

- anti-CD3 (muromonab) ;
- anti-CD20 (rituximab) ;
- anti-CD52 (alemtuzumab).

## Fiche 21.1

### **Surveillance d'un traitement par anticorps anti-CD20 (rituximab)**

#### **Signification biologique du paramètre**

Le traitement par un anticorps anti-CD20 est une thérapie cytolytique ciblant la majorité des cellules de la lignée lymphocytaire B à l'exception des progéniteurs les plus précoces et des plasmocytes producteurs d'anticorps. La surveillance biologique d'un traitement par rituximab repose sur l'évaluation de son efficacité et de sa tolérance. À côté d'une surveillance hématologique reposant sur l'étude de l'hémogramme du fait de neutropénies sévères, voire anémies ou thrombopénies survenant chez certains patients, un immunophénotypage de base peut être réalisé afin d'évaluer les lymphocytes B circulants résiduels chez le patient traité.

#### **Objectifs de l'analyse et principales indications**

Cet immunophénotypage réalisé en cytométrie en flux repose sur la quantification du pourcentage

mais surtout du nombre absolu de cellules CD19 positives retrouvées par  $\text{mm}^3$  de sang circulant. L'objectif est d'évaluer l'efficacité cytolytique de l'anticorps anti-CD20 sur ses cellules cibles, les lymphocytes B.

Cette surveillance est préconisée dans le cas de suivi de patients traités par rituximab souffrant d'un lymphome non hodgkinien, d'une leucémie lymphoïde chronique, d'une polyarthrite rhumatoïde, d'un rejet rénal chronique...

#### **Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Cet examen est proposé mais non obligatoire pour le suivi d'un traitement par anti-CD20.

<b>Nature du prélèvement</b>	Un seul tube de sang prélevé de préférence sur EDTA.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Le volume d'anticoagulant ne doit pas entraîner de dilution de l'échantillon.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement à température ambiante tempérée.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation du prélèvement à température ambiante avant analyse dans les 24 heures suivant l'heure de prélèvement.
<b>Principe méthodologique</b>	Les lymphocytes B sont marqués par un anticorps monoclonal couplé à un fluorochrome, spécifiques de la molécule pan-B CD19. Cette étape de marquage est suivie d'une lyse des globules rouges, avant acquisition au cytomètre en flux sans étape de lavage. La population lymphocytaire est sélectionnée selon des critères morphologiques de taille et de structure/granulosité seule ou avec un marquage concomitant par un anti-CD45 (marqueur pan-leucocytaire). La numération en valeur absolue (nombre de lymphocytes B par mm <sup>3</sup> de sang) est réalisée en simple plateforme avec de billes fluorescentes de concentration connue servant d'étalon interne ou, en double plateforme, en utilisant le nombre absolu de lymphocytes déterminé par un automate de numération, idéalement sur le même échantillon. Un immunophénotypage plus complet peut être réalisé.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisée (préparateur pour le marquage avec les anticorps, automate de lyse) ou automatisée.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Commerciaux.
<b>EEQ</b>	Oui.
<b>Performances du test</b>	Méthode sensible. La molécule CD19 est présente à la surface des lymphocytes B sanguins tout comme CD20. Cependant, CD19 est également exprimé par les plasmablastes et les plasmocytes. Les anticorps anti-CD19 et anti-CD20 n'ont donc pas exactement les mêmes cibles cellulaires. Néanmoins, ces plasmablastes et plasmocytes ne sont qu'en très faible proportion dans le sang circulant.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Dans le cas de l'utilisation de billes étalon pour déterminer les valeurs absolues, il est impératif de pipetter de façon précise les billes et le sang total. La présence de microcaillots peut être à l'origine de différences entre les résultats mesurés en simple ou double plateforme.

## Fiche 21.2

**Dosage des anticorps monoclonaux thérapeutiques****Signification biologique du paramètre**

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont utilisés dans des champs cliniques très variés : immunologie clinique, rhumatologie, gastroentérologie, hématologie, transplantation d'organes, cancérologie... Les protéines de fusion associées à la partie constante d'une immunoglobuline peuvent être assimilées à cette classe d'agents thérapeutiques.

Le dosage du taux circulant d'un anticorps monoclonal peut faire partie du suivi thérapeutique de certaines pathologies. Il concerne en premier lieu les anti-TNF (infliximab et adalimumab). En l'état actuel des connaissances, ce suivi n'a pas pour objectif l'adaptation de dose pour l'obtention d'un taux circulant thérapeutique non toxique comme dans le cas des médicaments classiques. En effet, il n'existe pas de relation claire entre la dose administrée, le taux circulant et la toxicité de ces anticorps monoclonaux. De la même façon, et du fait de variations individuelles très importantes dans la pharmacocinétique des anticorps monoclonaux, il n'existe pas encore de relation simple entre taux circulant et efficacité thérapeutique. De nombreuses études sur les anti-TNF et les anti-CD20 dans divers contextes cliniques sont actuellement en cours afin de clarifier

ce point. Le dosage d'un anticorps monoclonal vise essentiellement à identifier une cinétique accélérée d'élimination de l'anticorps liée notamment à la présence d'anticorps anti-drogue (ADA), pouvant être associée à une perte de l'efficacité thérapeutique.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Le dosage sérique des anticorps monoclonaux a deux indications principales :

- l'identification d'un taux résiduel de médicament qui risque d'interférer avec les techniques de détection des ADA et contre-indique donc leur réalisation ;
- l'évaluation de la cinétique d'élimination de l'anticorps monoclonal qui serait prédictive de l'efficacité thérapeutique dans certains contextes cliniques comme pour les anti-TNF dans la maladie de Crohn.

D'autres anticorps monoclonaux sont dosés dans des indications plus marginales, notamment en greffe de moelle (rituximab, alemtuzumab) ou dans le cadre d'essais cliniques.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Il s'agit d'un monitoring thérapeutique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré (4 semaines) ou congelé. Éviter les décongelations/congelations.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA maison ou commerciaux (infliximab, adalimumab), test maison de cytométrie en flux (rituximab, alemtuzumab).
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Le seuil de quantification varie selon l'anticorps monoclonal considéré.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	L'interprétation doit prendre en compte la pharmacocinétique particulière de chaque anticorps monoclonal (intervalle et mode d'administration), qui est toutefois sujette à de grandes variations individuelles dont seuls certains facteurs déterminants sont connus (polymorphisme génétique des récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines).

## Fiche 21.3

### Recherche d'une sensibilisation à un anticorps monoclonal thérapeutique

#### Signification biologique du paramètre

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont des agents potentiellement immunogènes. La fréquence de développement des anticorps anti-immunoglobuline, ou « anti-drogue » (ADA, *Anti-Drug Antibodies*), est liée à la présence de séquences peptidiques d'origine xénogénique (par ordre d'immunogénicité décroissante : anticorps murin, chimérique, humanisé ou entièrement humain). Le risque d'immunisation vis-à-vis d'un anticorps monoclonal thérapeutique est influencé par la nature de sa cible, son mode d'action (cytotoxicité), l'association à des thérapeutiques immunosuppressives et le type de protocole thérapeutique. Ce risque est quasi inexistant en cancérologie, mais significatif au cours du traitement des maladies auto-immunes ou inflammatoires, même avec des anticorps entièrement humains. Ainsi, jusqu'à 30 % des patients traités par adalimumab, un anti-TNF humain, développent des ADA. Les ADA peuvent être dirigés contre les régions idiotypiques de l'anticorps correspondant au site de reconnaissance antigénique et sont alors associés à une neutralisation de l'effet thérapeutique. Les ADA sont responsables d'une diminution des taux circulants résiduels de l'anticorps et peuvent induire des effets indésirables, accident anaphylactique de perfusion ou maladie sérique.

#### Objectifs de l'analyse et principales indications

La recherche d'ADA concerne principalement les anti-TNF. L'identification d'ADA, associée ou non à une perte de l'effet thérapeutique, peut conduire à modifier le traitement : augmentation de la dose, adjonction d'un immunosuppresseur, changement d'anticorps de la même classe (infliximab → adalimumab) ou changement de classe thérapeutique. Cette recherche peut être indiquée en cas de diminution de l'effet thérapeutique d'un anticorps monoclonal, dans le cadre d'un monitoring thérapeutique systématique ou après interruption d'un traitement par anticorps monoclonal, avant la reprise de celui-ci afin de prévenir tout accident immunoallergique. Des algorithmes décisionnels intégrant les résultats des taux circulants d'ADA anti-TNF et de la recherche d'ADA ont été proposés et sont en cours de validation pour d'autres pathologies (maladie de Crohn).

#### Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration

Il s'agit d'un monitoring thérapeutique.

<b>Nature du prélèvement</b>	Sérum.
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Aucune.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Température ambiante.
<b>Mode de conservation</b>	Réfrigéré (4 semaines) ou congelé. Éviter les décongelations/congelations.
<b>Principe méthodologique</b>	ELISA maison ou commerciaux pour l'infliximab et l'adalimumab. Tests classiques ou par compétition.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle, semi-automatisable.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative pour les tests effectuant une capture des ADA par l'anticorps, semi-quantitative pour les tests maison de détection des ADA anti-idiotypes neutralisants (mesure de l'inhibition de la capture de l'anticorps par du TNF).
<b>CIQ</b>	Maison ou commerciaux.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Seuil de quantification variable suivant l'anticorps monoclonal et la technique.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Les tests ELISA communément utilisés ne dosent que les ADA libres, non complexés à leur antigène cible. La recherche d'ADA n'est possible qu'en l'absence de taux résiduel de l'anticorps monoclonal thérapeutique dans le sérum. Il y a un risque de faux négatif en présence d'un excès d'anticorps monoclonal dans les tests ELISA classiques et un risque de faux positif dans les tests par inhibition de capture. Des tests plus récents comprenant une étape de dissociation des complexes ADA-anticorps monoclonal formés <i>in vivo</i> , permettent de doser la totalité des ADA (libres et complexés à l'anticorps) en présence d'un taux résiduel éventuel d'anticorps monoclonal : ELISA compétitif, chromatographie d'exclusion.

## Fiche 21.4

**Dosage des anticorps neutralisant l'interféron bêta****Signification biologique du paramètre**

L'interféron bêta 1a ou 1b (IFN- $\beta_{1a}$  ou IFN- $\beta_{1b}$ ) est utilisé en thérapeutique chez les patients atteints de sclérose en plaques. Ces interférons sont potentiellement immunogènes et certains patients développent des anticorps neutralisants dans les 6 à 8 mois après le début du traitement avec pour conséquence une perte d'efficacité clinique.

**Objectifs de l'analyse et principales indications**

Chez les patients atteints de sclérose en plaques traités par IFN- $\beta$ , le dosage des anticorps neutralisants sériques spécifiques représente un outil complémentaire aux données cliniques et à l'IRM habituellement utilisées pour apprécier la réponse au traitement. Les anticorps neutralisant l'IFN- $\beta$

doivent être dosés chez tous les patients traités depuis 1 à 2 ans par IFN- $\beta_{1a}$  ou IFN- $\beta_{1b}$ . Deux situations sont alors observées :

- l'absence d'anticorps permet la poursuite du traitement et impose un second dosage un an plus tard ; un contrôle ultérieur ne sera dès lors effectué qu'en présence de signes cliniques manifestes ;
- la positivité des anticorps implique un second dosage dans les 3 à 6 mois suivants. Une positivité persistante des anticorps impose alors l'arrêt du traitement par IFN- $\beta$  et le changement de molécule thérapeutique.

**Place dans la hiérarchie d'un bilan d'exploration**

Examen de seconde intention dans le bilan d'exploration d'une sclérose en plaques traitée par IFN- $\beta_{1a}$  ou IFN- $\beta_{1b}$ .

<b>Nature du prélèvement</b>	Un tube de sang de 7 mL doit être prélevé sur un tube sec sans gel chez un sujet 24 heures à 48 heures après la dernière prise d'IFN- $\beta$ .
<b>Recommandations pour la qualité du prélèvement</b>	Prendre contact avec le laboratoire exécutant pour les conditions d'envoi du sérum.
<b>Contraintes d'acheminement</b>	Acheminement congelé avec la fiche de renseignements cliniques préparée par le laboratoire exécutant.
<b>Mode de conservation</b>	Conservation congelée du sérum préalablement décanté en tube plastique.
<b>Principe méthodologique</b>	Après une préincubation de 1 heure avec l'IFN- $\beta$ à 37 °C, les sérums des patients sont incubés pendant 5 heures à 37 °C dans un incubateur à 5 % de CO <sub>2</sub> avec des cellules en culture issues de la lignée HL116 transfectée avec le gène de la luciférase sous contrôle d'un promoteur inductible par l'IFN. La présence d'anticorps neutralisants sériques se traduit par une diminution de la luminescence induite par l'IFN- $\beta$ sur les cellules en culture. Dans chaque série sont inclus des contrôles permettant de vérifier la viabilité cellulaire, la réactivité cellulaire à l'action de l'IFN- $\beta$ , l'absence de cytotoxicité endogène des échantillons sériques. Deux dilutions sériques sont effectuées d'emblée pour le screening des résultats négatifs et positifs. En cas de positivité, un dosage effectué sur plusieurs dilutions sériques est alors pratiqué dans une série ultérieure.
<b>Type de méthode</b>	Manuelle.
<b>Type de mesure</b>	Quantitative.
<b>CIQ</b>	Maison.
<b>EEQ</b>	Non.
<b>Performances du test</b>	Bonne valeur prédictive positive.
<b>Causes d'erreur, limites du test</b>	Le dosage doit être pratiqué chez un patient traité depuis au moins 1 an par IFN- $\beta$ pour que puisse être observée une éventuelle diminution de l'efficacité du traitement par les anticorps neutralisants sériques. Le prélèvement doit être effectué dans les 24 à 48 heures après la dernière injection d'IFN- $\beta$ pour éviter une interférence de la molécule administrée avec le dosage des anticorps neutralisants. La réalisation de ce dosage nécessite des compétences spécifiques pour sa réalisation technique et son interprétation.

## Bibliographie du chapitre 21

FICHE 21.1 – Surveillance d'un traitement par anticorps anti-CD20 (rituximab)

Reff ME, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83 : 435–45.

FICHE 21.2 – Dosage des anticorps monoclonaux thérapeutiques

Allez M, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases : Definitions, frequency and pharmacological aspects. *J Crohn Colitis* 2010; 4 : 355–66.

Eser A, et al. Drug monitoring of biologics in inflammatory bowel disease. *Curr Op Gastroenterol* 2013; 29 : 391–6.

Gao B, et al. Evidence for therapeutic drug monitoring of targeted anticancer therapies. *J Clin Oncol* 2012; 30 : 4017–25.

Khanna R, et al. A clinician's guide for therapeutic drug monitoring of infliximab in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38 : 447–59.

Mulleman D, et al. Should anti-TNF- $\alpha$  drug levels and/or anti-drug antibodies be assayed in patients treated for rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 2012; 79 : 109–12.

FICHE 21.3 – Recherche d'une sensibilisation à un anticorps monoclonal thérapeutique

Allez M, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflam-

matory bowel diseases : Definitions, frequency and pharmacological aspects. *J Crohn Colitis* 2010; 4 : 355–66.

Eser A, et al. Drug monitoring of biologics in inflammatory bowel disease. *Curr Op Gastroenterol* 2013; 29 : 391–6.

Khanna R, et al. A clinician's guide for therapeutic drug monitoring of infliximab in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38 : 447–59.

Mulleman D, et al. Ozsán GH et al. Should anti-TNF- $\alpha$  drug levels and/or anti-drug antibodies be assayed in patients treated for rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine* 2012; 79 : 109–12.

FICHE 21.4 – Dosage des anticorps neutralisant l'interféron bêta

Lam, et al. Validating parameters of a luciferase reporter gene assay to measure antibodies to IFN beta in multiple sclerosis patients. *J Immunol Methods* 2008; 336 : 113–8.

Pollman, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralizing antibodies to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010; 9 : 740–50.

Sorensen, et al. Guidelines on use of anti-IFN beta antibody measurements in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2005; 12 : 817–27.

Uze, et al. Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J Mol Biol* 1994; 243 : 245–57.

# Index

## A

- Abacavir, 235
- Activation lymphocytaire, 21
- Addison (maladie d'-), 90, 91, 233
- ALBIA, 30, 32-34, 39, 40, 43, 45, 49, 51, 62, 67, 70, 71, 99, 241, 243
- Allergène, 7, 8, 10, 21
- Amylose, 140, 142, 144, 146
- Anaphylaxie, 14
- ANCA, 38, 42-44, 74
- Angioedème, 157, 160, 169
- Anticorps
  - ACL, 48-51, 53
  - AMA-2, 59-62
  - anti-ADN, 27, 29, 31, 33, 34, 43, 59
  - anti-ADN-topoisomérase 1, 35
  - anti-anhydrase carbonique, 73
  - anti-annexine V, 54
  - anti-antigènes nucléaires solubles (ENA), 31
  - anti-antigènes onco-neuronaux, 106
  - anti-aquaporine, 108
  - anti-ARNt-synthétases, 98
  - anti-B2GPI, 48-51, 53, 54
  - anti-BP180, 119, 120
  - anti-BP230, 119-121
  - anti-cellules pariétales gastriques, 71
  - anti-centromère, 27, 35
  - anti-cytoplasme des neutrophiles. *Voir* ANCA
  - anticytoplasmiques, 26, 98
  - anti-cytosol, 61
  - anti-desmogléine, 121
  - anti-endomysium, 68
  - anti-envoplakine, 121, 122
  - anti-facteur intrinsèque, 72
  - anti-F-actine, 61, 62, 69
  - anti-GAD, 80-83
  - anti-gangliosides, 110
  - anti-gliadine déamidée, 70
  - anti-gp210, 59, 60
  - anti-histones, 34
  - anti-HLA, 240, 242
  - anti-21-hydroxylase, 91
  - anti-IA2, 80-83
  - anti-îlots de Langerhans, 80
  - anti-insuline, 80, 82, 83
  - anti-Jo1, 27, 31, 32, 98, 99
  - anti-Ku, 31, 100, 101
  - anti-LKM1, 61, 62
  - anti-lymphocytes T, 238
  - anti-membrane basale cutanée, 119
  - anti-membrane basale glomérulaire (MBG), 44, 45
  - anti-Mi2, 31, 100, 101
  - anti-mitochondries, 52, 59-61, 71, 107
  - anti-muscle lisse, 59, 61, 62
  - anti-muscle strié, 103
  - anti-MuSK, 102-104
  - anti-myéline, 113, 114
  - anti-myéloperoxydase (MPO), 42, 43
  - anti-NMDARr, 106
  - anti-NMO, 108
  - anti-NOR90, 35, 36
  - antinucléaires, 26, 27, 31
  - anti-nucléosomes, 33
  - anti-PCNA, 31, 32
  - anti-peptides ou protéines citrullinés, 40
  - anti-phospholipides, 48-50, 53
  - anti-phospholipides de type cardiolipine, 48
  - anti-PLA2-R, 46
  - anti-PML, 59
  - anti-PM/Scl, 31, 35, 36, 100, 101
  - anti-PR3, 42, 43
  - anti-protéines du complément, 166
  - anti-récepteur à l'asialoglycoprotéine, 64
  - anti-récepteur sensible au calcium, 93
  - anti-récepteurs de l'acétylcholine, 102
  - anti-réticuline, 68
  - anti-RNAP3, 35, 36
  - anti-RNP, 27, 31, 32
  - anti-R-TSH, 88, 89
  - anti-Scl70, 27, 31, 32, 35
  - anti-SGPG, 113, 114
  - anti-SLA, 62-64
  - anti-Sm, 27
  - anti-Sp100, 59, 60
  - anti-SRP, 98-100
  - anti-SSA, 27, 28, 31, 32

- anti-SSB, 27, 31, 32
- anti-substance intercellulaire, 121
- anti-surrénales, 90
- anti-Th/TO, 35, 36
- anti-thyroglobuline, 87
- anti-thyroperoxydase, 85
- anti-titine, 103, 104
- anti-transglutaminase, 66
- anti-ZnT8, 80, 82, 83
- ASCA, 74
- monoclonaux thérapeutiques, 256, 257, 259, 260
- AP50, 156, 158, 159
- Apoptose, 199
- Arthrite juvénile idiopathique, 27
- Associations HLA-maladies, 233

**B**

- Basedow (maladie de –), 86, 88, 89, 233
- Basophiles, 20
- Bence-Jones, 140, 146
- Biermer (maladie de –), 61, 71, 72
- Biologie moléculaire, 172, 228, 229, 231–235
- Biomédicaments, 253–264

**C**

- C1 inhibiteur, 157, 160, 168
- C3 *Nephritic factor*, 167
- Calprotectine, 75
- Capacité cytotoxique, 203
- CD18, 219
- CD25, 21, 193
- CD63, 20
- CD69, 21, 193
- CD107a, 203–206
- CD203c, 20
- Cellules HEp-2, 28, 31, 35, 60, 99, 101
- CH50, 163
- Chaînes légères libres, 144
- Cheveu, 207
- Chimérisme, 250
- Chimiluminescence, 5, 7, 43, 89, 150, 222
- Chimiotactisme, 220
- Choc septique, 162
- Cirrhose biliaire primitive, 27, 59, 61, 64
- CLIA, 43, 45
- Compatibilité tissulaire, 245–248
- Complément, 154
- Connectivite(s), 38, 48, 50, 61, 98
  - mixte, 27, 32, 100
- Crithidia luciliae*, 30
- Crossmatch lymphocytaire, 246
- CRP, 177
- Cryofibrinogène, 149

- Cryoglobuline, 148
- Cytokines, 21, 179, 198
- Cytométrie en flux, 20, 21, 108, 112, 170, 171, 185, 187, 189, 191, 193, 197, 198, 200, 202, 204, 206, 219, 222, 234, 246, 247, 259

**D**

- Déficit
  - commun variable, 128
  - de l'immunité humorale, 125–138, 132, 133
  - immunitaire, 128
  - lymphocytaire T, 128
- Dégranulation, 206
- Dermatomyosite, 27, 98, 100
- Dermatoses bulleuses auto-immunes, 118, 119, 121
- Diabète, 61, 73, 80, 82, 233
- DICV, 128
- Dosage pondéral des immunoglobulines, 132
- Dosages fonctionnels
  - de C2 et de C4, 163
  - de la voie alterne, 158
  - de la voie classique, 157
  - du C1 inhibiteur, 168
  - du facteur H et du facteur I, 164
- Dysglobulinémies, 140, 142

**E**

- ECP, 17
- Électrophorèse, 130, 142, 143, 145, 146
- Électrosynérèse, 32
- ELISA, 7, 10, 14, 16, 30, 32–34, 36, 39, 40, 43, 45, 49, 51, 53, 54, 60, 62–64, 67, 70–75, 83, 86, 87, 101, 112, 114, 120, 122, 132, 134, 136, 150, 151, 157, 159, 161, 162, 166, 167, 179, 212, 213, 241, 259, 261
- ELISPOT, 201, 202, 214, 215

**F**

- Facteur(s)
  - H, 164
  - I, 164
  - intrinsèque, 72
  - rhumatoïdes, 38, 40, 134
- FEIA, 7, 10, 17, 30, 32, 36, 39, 40, 43, 45, 49, 51, 67, 70, 75, 99, 101
- Fibrillarine, 35
- Fluorimétrie en flux, 39, 241, 243
- Fonctions lymphocytaires, 195–210
- Formes réactives de l'oxygène, 221

**G**

- Gammopathie monoclonale, 113, 132, 140, 142, 148, 166
- Gliadine, 66, 70

Glomérulonéphrite, 42, 44, 46, 148, 162  
 – lupique, 33  
 Glomérulopathie à C3, 156, 161

## H

Hashimoto (thyroïdite d<sup>-</sup>), 61, 85, 86  
 Hémagglutination, 86, 87  
 Hémoglobulinurie paroxystique nocturne (HPN), 171  
 HEp-2, 28, 31, 35, 60, 99, 101  
 Hépatite auto-immune, 59  
 – de type 1, 27, 61, 63, 64  
 – de type 2, 61, 64  
 Hépatopathies, 58, 59, 57–78  
 Histamine, 16  
 HLA. *Voir aussi* Typages HLA  
 – anticorps anti-HLA, 240, 242  
 – crossmatch lymphocytaire, 246  
 – HLA-B27, 233, 234  
 Hypersensibilité, 2, 7, 16, 20, 233, 235

## I

IEF, 147  
 IFI, 27, 28, 30, 43, 45, 46, 60, 62, 63, 69, 71,  
 74, 81, 86, 91–93, 99, 101, 104, 107, 108,  
 114, 120, 122  
 IgA, 66, 132  
 IgD, 151  
 IgE, 4, 6–8  
 IgG, 132  
 IgG4, 10  
 IgM, 132  
 Immunodot, 30, 32–34, 36, 43, 45, 49, 51, 53, 60,  
 62, 63, 67, 70–72, 99, 101, 107, 112  
 Immunoelectrophorèse, 131, 142–144, 146  
 Immunofixation, 146  
 Immunofluorescence, 5, 7, 27, 36, 43, 52, 72, 86  
*Voir aussi* IFI  
 Immunoglobuline monoclonale, 113, 140, 142,  
 144, 146  
 Immunophénotypage, 186, 188, 190, 181–194  
 Interféron bêta, 262

## L

LAD (*Leukocyte Adhesion Deficiency*), 219  
 LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adult*), 80,  
 82  
 Larmes, 6  
 Lavage bronchoalvéolaire, 188  
 LCR, 30, 106, 112, 147, 179, 190  
 Lupus érythémateux systémique, 27, 29, 31, 33, 34,  
 38, 48, 50, 100, 150, 157, 160, 162  
 Lymphocytes  
 – NK, 205

Lymphocytes B, 186, 188, 190, 192  
 Lymphocytes NK, 186, 188, 190, 192  
 Lymphocytes T, 184, 186, 188, 190, 192, 196, 198,  
 199, 203  
 – spécifiques d'antigènes, 201

## M

Maladie(s)  
 – associations HLA, 233  
 – cœliaque, 61, 65, 66, 68, 70, 233  
 – d'Addison, 90  
 – de Basedow, 88  
 – de Biermer, 61, 71, 72  
 – de Bruton, 128  
 – de Crohn, 74  
 – de Waldenström, 113  
 – neuromusculaires, 96  
*Mannan Binding Lectin*, 165  
 Mastocytes, 14  
*Membrane Cofactor Protein*, 170  
 $\beta_2$ -microglobuline, 150  
 Microlymphocytotoxicité, 229, 238, 246  
 Micropuce, 8  
 Multiplex, 179, 241, 243  
 Myasthénie, 102–104, 233  
 Myélome, 5, 67, 113, 134, 142, 144–146, 145, 146,  
 150, 151  
 Myosite, 98, 100

## N

Néphélémétrie, 5, 39, 132, 134, 147, 151, 160,  
 161, 163  
 Neuromyéélite optique, 108  
 Neuropathie, 110, 113, 148  
 NK, 186, 190, 192, 205

## O

Ouchterlony, 32, 36, 101

## P

PCR, 172, 228, 229, 231, 232, 234, 235, 251  
 PCT, 177  
 Pemphigoïde, 119  
 PHA, 21, 200, 215  
 Pneumallergènes, 7  
 Polyarthrite rhumatoïde, 34, 37–40, 104, 150, 257  
 Polyendocrinopathies auto-immunes, 90, 92, 93  
 Polymyosite, 27  
 Polynucléaires neutrophiles, 42, 43, 74, 75, 218–221,  
 217–224, 223  
 Polyradiculonévrite, 110, 111  
 Processus inflammatoire, 176  
 Prolifération lymphocytaire, 196, 197

## Protéines

- de la phase aiguë, 177
  - du LCR, 147
  - sériques, 130, 142
  - urinaires, 145
- Protéinurie de Bence-Jones, 140, 146
- Purpura fulminans, 158

**Q**

Quantiferon®, 212

**R**

- Récepteurs de cytokine, 179
- RIA, 16, 30, 63, 64, 67, 70, 83, 86, 87, 91, 102, 104

**S**

- SAA (protéine sérique amyloïde A), 177
- Sarcoidose, 61
- Sclérodémie, 27, 31, 32, 35, 61, 100
- Sclérose en plaques, 108, 147, 233, 262
- Sérologies vaccinales, 135
- Sous-classes d'IgG, 133, 134
- Spondylarthrite ankylosante, 234
- Stéroïdes, 92
- Stiff Man syndrome*, 83
- Syndrome
- de Chediak-Higashi, 207
  - de chevauchement, 100
  - de Devic, 108
  - de Gougerot-Sjögren, 27, 32, 38, 61
  - de Griscelli, 207
  - de Guillain-Barré, 110
  - de Sharp, 27
  - de Sjögren, 73
  - des anti-phospholipides, 48–54

- inflammatoire, 176
  - lymphoprolifératif, 132, 148, 150, 199
  - paranéoplasique, 106
  - pneumo-rénal, 44
  - SHU, 156, 160–162, 164, 166, 170, 172
  - SNAPS, 53
  - *Stiff Man*, 83
  - TRALI, 238
- Système du complément
- voie alterne, 154, 158, 160
  - voie classique, 154, 157, 161, 163
  - voie des lectines, 154, 165

**T**

- Test(s)
- de Farr, 30
  - hémolytiques, 163, 164, 167
- Thrombose, 48, 50, 53, 54, 161
- Thyroïdite, 61, 85, 87
- Triple substrat, 52, 59, 60, 62, 63, 68
- Trophallergènes, 7
- Tryptase, 14
- T-SPOT.TB®, 214
- Turbidimétrie, 39, 132, 134, 147, 151, 160
- Typages HLA, 228, 229, 231

**V**

- Vascularites, 38
- Voie
- alterne, 154, 158–160, 164, 167, 172
  - classique, 154, 157, 161, 163
  - des lectines, 154, 165

**W**

Western blot, 32, 36, 62, 73, 114, 148, 149