

Ac anti-ENA (anti-antigènes nucléaires solubles)

Les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (ENA : *extractable nuclear antigens*), anciennement appelés ECT (extrait de cellules thymiques), reconnaissent des composants solubles en solution saline de composants du noyau, mais aussi du cytoplasme cellulaire (à la différence des antigènes chromatiniques, qui se sont pas « extractibles » de cette façon). Il en a été décrit au moins une centaine dont six sont suffisamment fréquents pour être les seuls recherchés en routine : anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Sm, anti-U1-RNP, anti-Scl-70 et anti-Jo-1.

Ces anticorps sont responsables de fortes fluorescences en immunofluorescence indirecte sur les cellules HEP2, lors de leur recherche de première intention. Cependant, les aspects qu'ils donnent ne sont pas suffisamment spécifiques pour autoriser leur identification en IFI, soit parce que plusieurs anticorps anti-nucléaires donnent les mêmes aspects, soit parce que ces anticorps sont fréquemment associés entre eux, donnant des aspects mixtes. Enfin, la sensibilité du substrat peut être prise en défaut, comme c'est parfois le cas pour les anti-SSA/Ro, et des aspects de fluorescence atypiques ne sont pas rares.

D'autres méthodes de détection et d'identification sont alors indispensables. Elles sont automatiquement mises en œuvre, à l'initiative du biologiste, en même temps que la recherche d'anticorps anti-ADN natif, dès lors que les anti-nucléaires sont positifs en IFI et quel qu'en soit l'aspect ou à l'initiative du clinicien, lorsque le tableau clinique est évocateur (recherche des anti-SSA, par exemple, même si les anti-nucléaires sont négatifs).

Immunodiffusion double selon Ouchterlony et contre-immunoelectrophorèse (électrosynérèse)

Le principe est simple : l'antigène et l'antisérum déposés dans les puits d'une gélose migrent dans celle-ci et les complexes antigène-anticorps précipitent à l'équilibre. Le principe de l'identification repose sur l'utilisation d'antisérums de spécificités connues, placés de part et d'autre du sérum à tester, qui donnent avec l'arc de précipitation de celui-ci les réactions classiques d'identité, par continuité totale ou partielle des arcs de précipitation. L'électrosynérèse, utilisant une migration dans un champ électrique, est plus rapide. Le pH du gel est choisi de telle façon que les anticorps soient chargés positivement et l'antigène négativement. Sous l'action

du courant électrique, les anticorps et l'antigène migrent les uns vers les autres et précipitent.

La qualité de l'analyse dépend avant tout de la qualité du mélange d'antigènes du réactif : l'extrait antigénique obtenu à partir d'organes lymphoïdes de veau ou de lapin (thymus) et de primates (rate humaine). Les quantités respectives d'extrait antigénique et de sérum doivent être soigneusement ajustées. Les autoanticorps reconnaissent les antigènes natifs mais seuls les anticorps précipitants sont mis en évidence.

Cependant, ces techniques d'immunodiffusion restent peu sensibles et sont longues (première lecture à 5-6 heures puis deuxième lecture à 24 heures pour l'Ouchterlony). Pour certaines spécificités, notamment lorsque l'antigène recombinant n'est pas disponible, ce sont les techniques les plus utilisées en routine : PCNA, PM-Scl...

Techniques immunoenzymatiques

Les techniques ELISA sont beaucoup plus sensibles et permettent le dosage quantitatif des anticorps. Elles mettent en jeu des antigènes purifiés par des techniques chromatographiques ou d'immuno-affinité qui sont non dénaturantes et permettent de purifier théoriquement les antigènes natifs ou qui le plus souvent utilisent des antigènes recombinants. Les antigènes sont alors obtenus par génie génétique, par clonage des gènes des antigènes d'intérêt et leur expression dans des systèmes cellulaires procaryotes ou, au mieux, eucaryotes, qui permettent la glycosylation de la molécule recombinante, plus proche alors de la molécule native. Comme toute technique ELISA, elles posent le problème de la définition de leur seuil de positivité, qui détermine la sensibilité et la spécificité de l'analyse.

Techniques d'immunoempreintes (immunoblot, immunodot)

Les antigènes nucléaires sont séparés par électrophorèse puis transférés sur membrane de nitrocellulose (western blot ou immunoblot). La technique dépolymérise donc les protéines complexes en plusieurs peptides et les anticorps ne reconnaissent que les épitopes conformationnels ne sont pas mis en évidence. À l'inverse, cette préparation de l'antigène peut révéler des épitopes peu accessibles sur la protéine native.

L'immunodot se rapproche des techniques ELISA (l'antigène n'est pas dénaturé par séparation électrophorétique) avec le même problème lié au mode de préparation des antigènes. Il pose le même problème de la subjectivité des lectures que les techniques d'immunodiffusion.

Techniques de cytométrie en flux ou technologie Luminex®

Cette technologie repose sur l'utilisation de microbilles de polystyrène comme support d'antigène. Les billes sont colorées par un mélange de 2 marqueurs fluorescents (un fluorochrome orange et un fluorochrome rouge), produisant différents niveaux de fluorescence. Sur des billes de colorations différentes sont couplées de manière covalente les molécules d'intérêt. Ces différents types de billes, chacune spécifique d'un antigène, sont mélangées, permettant la mise en évidence de plusieurs anticorps simultanément dans le sérum. La réaction antigène-anticorps est révélée par l'ajout d'un conjugué fluorescent. Par lecture cytofluorimétrique, les différentes spécificités sont identifiées et quantifiées. Cette technologie est utilisée par plusieurs firmes, qui commercialisent des kits de détection de larges panels d'autoanticorps (connective, rhumatoïde, cœliaque, thyroïde), et de sérologies infectieuses. Elle est très séduisante car entièrement automatisée (dilution, distribution, incubation, lavage), et parce qu'il est possible d'établir un profil complet en une seule prise d'essai.

On note d'importantes variations de la fréquence des anti-ENA au cours des maladies systémiques, selon les auteurs. Cela peut être dû à plusieurs raisons :

- les antigènes utilisés par les techniques immuno-enzymatiques diffèrent, selon qu'ils sont obtenus par purification ou par génie génétique, avec, dans ce cas, le rôle important joué par le système d'expression : procaryote ou eucaryote, seul capable d'assurer la glycosylation des protéines. La séparation des protéines par électrophorèse et leur transport sur membrane peuvent modifier la réactivité des antigènes, lorsque les épitopes sont conformationnels, et rendre compte des échecs rencontrés dans certains cas avec les immunoempreintes ;
- les différences de sensibilité des diverses techniques utilisées.

C'est pourquoi leur fréquence d'association aux différentes maladies systémiques peut varier sensiblement d'un auteur à l'autre et leur interprétation en biologie clinique peut être parfois délicate.

☞ *Ac anti-histones, Ac anti-nucléaires, Ac anti-Scl-70, Ac anti-Sm et U1-RNP, Ac anti-SSA/Ro et anti-SSB/La, Ac anti-synthétases*



Chevallier A, Beauvillain C, Carrère F.
Dépistage des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles.
Rev Fr Lab 2006 ; 36/384 : 59-70.