

Les marqueurs biologiques du lupus érythémateux disséminé, intérêt des anticorps anti-ficoline H

Élise Baron Lhéritier

▶ **To cite this version:**

Élise Baron Lhéritier. Les marqueurs biologiques du lupus érythémateux disséminé, intérêt des anticorps anti-ficoline H. Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-01254728

HAL Id: dumas-01254728

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01254728

Submitted on 12 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier GRENOBLE MEDECINE

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2013 **Thèse n°**

Les marqueurs biologiques du lupus érythémateux disséminé, intérêt des anticorps anti-ficoline H

Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Soutenue publiquement à la Faculté de Médecine de Grenoble

le 13 septembre 2013

par**Elise Baron épouse Lhéritier**

née le 3 novembre 1985 à Paris (14e)

Devant le jury composé de :

Président : Monsieur le Professeur J-Y. CESBRON

Membres : Madame le Docteur C.DUMESTRE-PERARD (directrice de thèse)

Madame le Professeur L. BOUILLET

Monsieur le Docteur J. GAGNON

Madame le Docteur G. CLAVARINO

La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Faculté de Médecine Postes PU-PH 2012-2013

PUPH 2012-2013

Nom - Prénom	Discipline
ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	chirurgie générale
BACONNIER Pierre	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
BAGUET Jean-Philippe	Cardiologie
BALOSSO Jacques	Radiothérapie
BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
BAUDAIN Philippe	Radiologie et imagerie médicale
BEANI Jean-Claude	Dermato-vénéréologie
BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
BERGER François	Biologie cellulaire
BLIN Dominique	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
BOSSON Jean-Luc	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
BOUILLET Laurence	Médecine interne
BRAMBILLA CHRISTIAN	Pneumologie
BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
CAHN Jean-Yves	Hématologie
CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire

CESBRON Jean-Yves	Immunologie
CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
CHAFFANJON Philippe	Anatomie
CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
CHIQUET Christophe	Ophtalmologie
CHIROSSEL Jean-Paul	Anatomie
CINQUIN Philippe	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
COHEN Olivier	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
DE GAUDEMARIS Régis	Médecine et santé au travail
DEBILLON Thierry	Pédiatrie
DEMATTEIS Maurice	Addictologie
DEMONGEOT Jacques	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
DESCOTES Jean-Luc	Urologie
ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
FAUCHERON Jean-Luc	chirurgie générale
FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
FEUERSTEIN Claude	Physiologie
FONTAINE Eric	Nutrition
FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
GAUDIN Philippe	Rhumatologie
GAVAZZI Gaetan	Gériatrie et biologie du vieillissement

GAY Emmanuel	Neurochirurgie
GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
HALIMI Serge	Nutrition
HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
HOMMEL Marc	Neurologie
JOUK Pierre-Simon	Génétique
JUVIN Robert	Rhumatologie
KAHANE Philippe	Physiologie
KRACK Paul	Neurologie
KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
LABARERE José	Département de veille sanitaire
LANTUEJOUL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
LE BAS Jean-François	Biophysique et médecine nucléaire
LEBEAU Jacques	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
LEROUX Dominique	Génétique
LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
LETOUBLON Christian	chirurgie générale
LEVY Patrick	Physiologie
LUNARDI Joël	Biochimie et biologie moléculaire
MACHECOURT Jacques	Cardiologie
MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MAITRE Anne	Médecine et santé au travail

MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
MORO Elena	Neurologie
MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlogie
PALOMBI Olivier	Anatomie
PASSAGIA Jean-Guy	Anatomie
PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PISON Christophe	Pneumologie
PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
POLACK Benoît	Hématologie
PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
RAMBEAUD Jacques	Urologie
REYT Emile	Oto-rhino-laryngologie
RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
ROMANET J. Paul	Ophtalmologie

SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
SCHWEBEL Carole	Réanimation médicale
SERGENT Fabrice	Gynécologie obstétrique
SESSA Carmine	Chirurgie vasculaire
STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
TIMSIT Jean-François	Réanimation
TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
VANZETTO Gérald	Cardiologie
VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
ZAOUI Philippe	Néphrologie
ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

Service du personnel site santé **Mise à jour 28/09/2012**

Faculté de Médecine Postes MCU-PH 2012-2013

MCU-PH 2012/2013

Nom - Prénom	Discipline
APTEL Florent	Ophtalmologie
BOISSET Sandrine	Agents infectieux
BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
BOUTONNAT Jean	Cytologie et histologie
BOUZAT Pierre	Réanimation
BRENIER-PINCHART M.Pierre	Parasitologie et mycologie
BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
DERANSART Colin	Physiologie
DETANTE Olivier	Neurologie
DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
GILLOIS Pierre	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine	Physiologie
MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
MC LEER (FLORIN) Anne	Cytologie et histologie
MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
MOUCHET Patrick	Physiologie
PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé

PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
RAY Pierre	Génétique
RIALLE Vincent	Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication
ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
SATRE Véronique	Génétique
STASIA Marie-Josée	Biochimie et biologie moléculaire
TAMISIER Renaud	Physiologie

Remerciements

Au Président du jury, Monsieur le Professeur J-Y. Cesbron,
Je vous remercie d'avoir accepté d'être le Président du jury de ma thèse et pour tous vos conseils au cours de mes semestres en immunologie.

A la directrice de Thèse, Madame le Docteur C. Dumestre-Perard,
Je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré, pour ton investissement dans l'avancement du projet et pour ton attention.

À Madame le Professeur L. Bouillet,
Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à mon jury pour juger mon travail.
Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

À Monsieur le Docteur J. Gagnon,
Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à mon jury pour juger mon travail.
Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

À Madame le Docteur G. Clavarino,
Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci aussi pour ton aide pour la bibliographie et pour ta bonne humeur.

À Madame le Docteur F. Sarrot-Raynauld,
Je vous remercie de m'avoir envoyé vos patients lupiques pour qu'ils puissent être prélevés et pour vos réponses très complètes à mes questions.

Aux biologistes médicaux et aux techniciens du laboratoire d'immunologie du CHU de Grenoble,
J'ai apprécié l'année passée avec vous, merci pour tout ce que j'ai appris à votre contact en immunologie et pour tous les bons moments passés ensemble.

A ma famille et mes amis, pour votre soutien et les moments partagés.

A Jean-Baptiste, pour ton appui précieux.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ABREVIATIONS..... 12

INTRODUCTION..... 14

1. Le lupus érythémateux disséminé, marqueurs biologiques actuels et leurs limites..... 15

1.1. Présentation générale du lupus : une maladie auto-immune systémique 15

1.2. Les anticorps anti-nucléaires chez les patients lupiques 19

1.3. Le complément..... 32

2. La ficoline H 41

2.1. Circonstance de découverte..... 41

2.2. Présentation générale 42

2.3. Concentration variable chez les patients lupiques..... 44

2.4. Analogie avec C1q et MBL..... 44

2.5. Rôle anti-infectieux limité et concentration importante..... 46

2.6. Rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques 47

OBJECTIFS DU PROJET 48

MATERIELS ET METHODES..... 50

1. Type d'étude..... 51

2. Tests statistiques 51

3. Population 52

3.1. Critères diagnostiques et de suivi de l'activité lupique 52

3.2. Nombre, sexe et âge des patients lupiques et caractéristiques des sujets sains 52

4. Techniques..... 53

4.1. Anticorps anti-ficoline H..... 53

4.2. Anticorps anti-C1q..... 55

4.3. Anticorps anti-ADN..... 56

RESULTATS..... 58

1. Les anticorps anti-ficoline H chez les sujets sains et chez les patients lupiques..... 59

2. Corrélation entre les anticorps anti-ficoline H et l'activité lupique..... 60

3. Les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-ADN double brin..... 62

3.1. Anticorps anti-ADN : corrélation entre 2 coffrets et corrélation avec le SLEDAI..... 62

3.2. Corrélation entre anticorps anti-ficoline H et anticorps anti-ADN (Bio-rad™)..... 66

4. Les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-C1q..... 67

5. Différents profils de patients lupiques en poussée et anticorps anti-ficoline H..... 68

5.1. Les différents types de poussées rencontrées..... 68

5.2. Résultats de l'étude transversale..... 69

5.3. Résultats de l'étude longitudinale..... 70

DISCUSSION et CONCLUSION..... 77

ANNEXE..... 82

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 84

TABLE DES ABREVIATIONS

- : Négatif

+ : Positif

ACR : « American college of rheumatology »

ADN : Acide desoxyribonucleosidique

BSA : “ Bovine serum albumin “

C. luciliae : *Crithidia luciliae*

CIC : Complexes immuns circulants

CR1 : « Complement receptor 1 »

« Cut-off » : sérum constitué d’un « pool » correspondant au seuil de positivité et inclus dans chaque manipulation

Db : Double brin

DO : Densité optique

ECBU : Examen cytobactériologique des urines

EFS : Etablissement français du sang

ELISA : « Enzyme linkedimmunosorbentassay »

ENA : « Extractablenuclearantigen »

FN : Faux négatifs

FP : Faux positifs

Hep2 : Human epithelial cell line type 2

IFI : Immunofluorescence indirecte

Ig : Immunoglobulines

LE : Lupus érythémateux

Lupus : Lupus érythémateux disséminé

MASP : “MBL associated serine proteases”

Max : Maximum

MBL : « Mannose-binding lectin »

Min : Minimum

NABM : Nomenclature des actes de biologie médicale

PAR : Polyarthriterhumatoïde

PBS : “ Phosphate buffered saline ”

PCNA : “Proliferating cell nuclear antigen”

« Pool » : Regroupement

RVN : Rapport de vraisemblance négatif

RVP : Rapport de vraisemblance positif

SAPL : Syndrome des anti-phospholipides

Sb : Simple brin

Se : Sensibilité

SLEDAI : « Systemic lupus erythematosus disease activity index »

SLEDAIm : SLEDAI modifié

sMAP : “Small MBL associated protein”

Sp : Spécificité

TMB : “Tetramethyl benzidine”

UA : Unités arbitraires

UI/ml : Unités internationales / millilitre

INTRODUCTION

1. Le lupus érythémateux disséminé : marqueurs biologiques actuels et leurs limites

1.1. Présentation générale du lupus : une maladie auto-immune systémique

Le lupus est une maladie auto-immune systémique qui peut atteindre de nombreux organes, d'origine mal connue (facteurs génétiques et environnementaux). Selon un médecin interniste californien, E L Dubois (1923-85) : le lupus est un « Syndrome clinique de cause inconnue, avec atteinte systémique touchant un ou plusieurs appareils évoluant par poussées, entrecoupé de rémissions multiples ».

1.1.1. Démographie

L'incidence du lupus varie de 1 à 5/100 000 et sa prévalence de 20 à 150/100 000 habitants. Cette maladie affecte plus d'un million de personnes chaque année dans le monde. Les femmes sont atteintes neuf fois plus que les hommes [11] et la fréquence est 2 à 8 fois plus élevée pour les populations non européennes en particulier les africains ; de même l'atteinte rénale est plus fréquente dans ces populations [12]. La plupart du temps la maladie apparaît entre 20 et 40 ans.

1.1.2. Clinique

Le diagnostic de lupus se fait sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. La classification diagnostique de l'ACR (« American college of rheumatology ») est utilisée depuis 1997 [35] ; elle est basée sur 11 critères cliniques et biologiques. Le diagnostic de lupus est retenu si le patient présente à un moment donné 4 des 11 critères (tableau 1). Cependant il faut rester prudent ; un diagnostic peut être remis en cause selon l'évolution clinique et biologique et le lupus se compliquer d'une autre maladie auto-immune.

Les signes cliniques sont très variés ; le patient peut présenter :

-des signes généraux : de la fièvre, une asthénie parfois associées à une élévation des marqueurs de l'inflammation ;

- une atteinte cutaneo-muqueuse : fréquente, notamment la fameuse éruption en masque de loup qui a donné son nom au lupus, mais aussi des atteintes sévères comme des nécroses digitales ;

- Rash malaire
- Lupus discoïde
- Photosensibilité
- Ulcérations orales ou nasopharyngées
- Arthrites non érosives touchant au moins 2 articulations périphériques, caractérisées par une douleur, un gonflement ou un épanchement
- Pleurésie ou péricardite
- Protéinurie persistante > 0,5 g/jour ou cylindrurie
- Convulsions ou psychose (en l'absence de cause médicamenteuse ou métabolique)
- Atteinte hématologique:
  - anémie hémolytique
  - ou leucopénie < 4000/µl constatée à 2 reprises
  - ou lymphopénie < 1500/µl constatée à 2 reprises
  - ou thrombopénie < 100 000/µl, en l'absence de drogues cytopéniantes
- Titre anormal de facteurs anti-nucléaires par immuno-fluorescence (en l'absence de drogues inductrices)
- Perturbations immunologiques:
  - Titre anormal d'anticorps anti-ADN natif
  - ou anticorps anti-Sm
  - ou présence d'anticorps antiphospholipides: sérologie syphilitique dissociée constatée à 2 reprises en 6 mois ou anticoagulant circulant de type lupique
  - ou titre anormal d'anti-cardiolipine en IgG ou IgM

Tableau 1 : Critères de l'ACR (1997) pour le diagnostic de lupus (4 /11 critères nécessaires) [35]

- une atteinte articulaire : très fréquente, avec des arthralgies inflammatoires et des signes locaux d'arthrite érosive. Elle touche principalement les mains, les genoux et les chevilles. L'atteinte musculaire est moins fréquente, sous la forme de myalgies le plus souvent ;

- une atteinte hématologique : détectée biologiquement en l'absence d'autres causes notamment médicamenteuses ; cela peut être une thrombopénie, une leucopénie ou éventuellement une anémie ;

- une atteinte cardio-pulmonaire : le plus souvent sous la forme d'une péricardite ou d'une pleurésie ;

-une atteinte digestive et hépatique : peu fréquentes ;

-une atteinte psychiatrique et neurologique : essentiellement du système nerveux central ;

- une atteinte ophtalmologique ;

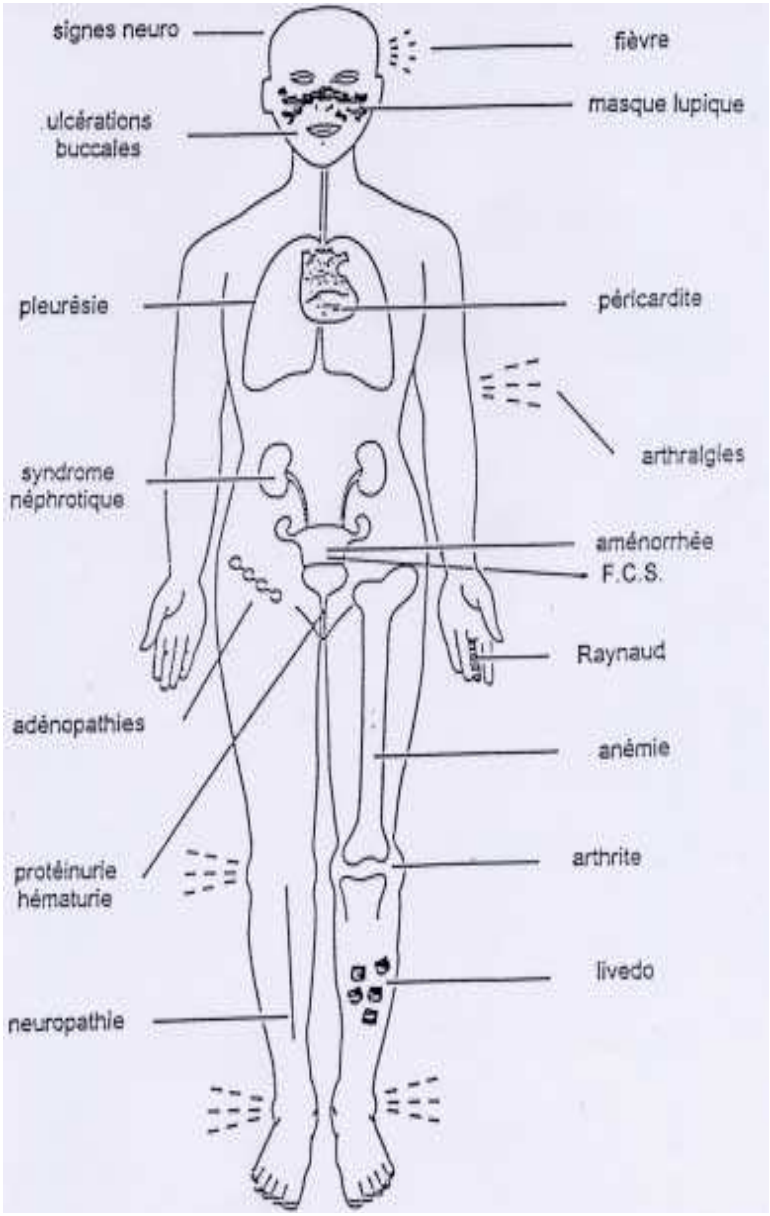


Figure 1 : Représentation schématique des différentes atteintes du lupus érythémateux systémique[66]

- une atteinte rénale : elle conditionne souvent le pronostic et peut aller jusqu'à l'insuffisance rénale terminale, c'est la plupart du temps une glomérulonéphrite qui peut être classée en différents stades histologiques qui orientent le traitement. Il existe deux classifications de ces différents stades (tableau 2) [12]. L'atteinte rénale est détectée par des marqueurs biologiques aspécifiques (protéinurie, créatinine, ECBU (Examen cytobactériologique des urines)...) et par d'autres plus spécifiques détaillés dans la suite de cette introduction.

WHO and ISN/RPS classifications of lupus nephritis (LN).

	WHO	ISN/RPS
Class I	*Normal glomeruli* a. Nil (by all techniques) b. Normal by light microscopy, but deposits by IF or electron microscopy	*Minimal mesangial LN* Normal glomeruli by LM, but mesangial immune deposits by IF
Class II	*Pure mesangial alterations* a. Mesangial widening and/or mild hypercellularity (+)	*Mesangial proliferative LN* Pure mesangial hypercellularity of any degree or mesangial matrix expansion by light microscopy, with mesangial immune deposits
	b. Moderate hypercellularity (++)	Maybe a few isolated subepithelial or subendothelial deposits visible by IF or electron microscopy, but not by LM
Class III	*Focal segmental glomerulonephritis* Active or inactive focal, segmental or global GN involving <50% of all glomeruli	*Focal LN*
	a. With active necrotizing lesions	Class III (A) active lesions: focal proliferative LN
	b. With active and sclerosing lesions	Class III (A/C) active and chronic lesions: focal proliferative and sclerosing LN
	c. With sclerosing lesions	Class III (C) chronic inactive lesions with glomerular scars: focal sclerosing LN
Class IV	*Diffuse glomerulonephritis* (severe mesangial, endocapillary or mesangiocapillary proliferation and/or extensive subendothelial deposits) a. Without segmental lesions	*Diffuse LN* Active or inactive diffuse, segmental or global GN involving ≥50% of all glomeruli; divided into: – diffuse segmental (IV-S) LN when ≥50% of the involved glomeruli have segmental lesions (involving less than half of the glomerular tuft); – diffuse global (IV-G) LN when ≥50% of the involved glomeruli have global lesions.
	b. With active necrotizing lesions	Class IV-S (A) active lesions: diffuse segmental proliferative LN Class IV-G (A) active lesions: diffuse global proliferative LN
	c. With active and sclerosing lesions	Class IV-S (A/C) active and chronic lesions: diffuse segmental proliferative and sclerosing LN Class IV-G (A/C) active and chronic lesions: diffuse global proliferative and sclerosing LN
	d. With sclerosing lesions	Class IV-S (C) chronic inactive lesions with scars: diffuse segmental sclerosing LN Class IV-G (C) chronic inactive lesions with scars: diffuse global sclerosing LN
Class V	*Diffuse membranous glomerulonephritis* a. Pure membranous glomerulonephritis	*Membranous LN* Global or segmental subepithelial immune deposits or their morphologic sequelae by LM and by IF or electron microscopy, with or without mesangial alterations
	b. Associated with lesions of class II	Class V LN may occur in combination with class III or IV, in which case both will be diagnosed
	c. Associated with lesions of class III	Class V LN demonstrates advanced sclerosis
	d. Associated with lesions of class IV	
Class VI	Advanced sclerosing glomerulonephritis	Advanced sclerotic LN ≥90% of glomeruli globally sclerosed without residual activity

GN = glomerulonephritis; IF = immunofluorescence; LM = light microscopy.
WHO = World Health Organization.
ISN/RPS = International Society of Nephrology and the Renal Pathology Society.

Tableau 2 : Classifications de la néphrite lupique [103], [17]

1.1.3. Evolution et pathologies associées

Le lupus a une évolution imprédictible avec une alternance de poussées et de rémissions.

Les complications peuvent être graves : insuffisance rénale chronique, neurolupus notamment. De nombreux scores d'activité du lupus ont été mis au point, comme le M-SLAM (« Modifiedsystemic lupus activitymeasure ») ou le BILAG (« British Isles Lupus Assessment Group »), le plus utilisé est le SLEDAI (« Systemic lupus erythematosusdiseaseactivity index »)(annexe 1) [10]. C'est celui que nous utiliserons dans notre étude.

Un lupus peut fréquemment être associé à un SAPL (Syndrome des anti-phospholipides) qui fait d'ailleurs partie des critères diagnostiques et qui est une cause non négligeable de morbidité. Parfois c'est même la première manifestation de la maladie qui ne se déclenchera clairement que plus tard.

Dans son évolution le lupus peut se compliquer d'autres maladies auto-immunes comme la sclérodermie ou le syndrome de Gougerot-Sjögren réalisant alors un syndrome de chevauchement.

1.2. Les anticorps anti-nucléaires chez les patients lupiques

Avant la découverte des anticorps anti-nucléaires, c'est la cellule LE (Lupus érythémateux) qui a été un des premiers marqueurs biologiques du lupus.

La cellule LE est un polynucléaire neutrophile (le plus souvent) ayant phagocyté le noyau d'une cellule lysée marquée par des anticorps anti-nucléaires ; sa mise en évidence peut se faire directement dans le sang du patient ou en mettant en contact son sérum, contenant des anticorps anti-nucléaires, avec des polynucléaires d'un sujet sain [32]. Mais cette technique n'est pas spécifique du lupus (les cellules LE sont parfois retrouvées dans la polyarthrite rhumatoïde, dans des hépatites chroniques…), elle a donc été abandonnée au profit de la recherche directe des anticorps anti-nucléaires.

1.2.1. Détection des anticorps anti-nucléaires par immunofluorescence indirecte

Développée peu après la recherche des cellules LE la détection des anticorps anti-nucléaires se fait le plus souvent par IFI (Immunofluorescence indirecte) sur cellules Hep-2 (« Humanepithelialcell line type 2 »). Ces cellules sont issues d'un cancer laryngé humain, elles présentent de nombreuses mitoses et un gros noyau bien visible : caractéristiques essentielles pour bien lire et interpréter l'IFI. La recherche d'anticorps anti-nucléaires est un test de dépistage qui lorsqu'il est positif nécessite des tests d'identification et un titrage. Le dépistage se fait habituellement à la dilution du 1/80ème puis le titrage jusqu'à la dilution du 1/1280ème ; le titrage correspond à l'inverse de la dernière dilution positive. Des titres faibles sont fréquents dans la population générale. Cette recherche est toujours à associer à la clinique et si elle est positive à d'autres tests car elle est non spécifique.

Chez les patients lupiques l'aspect des cellules en IFI est variable et évocateur d'un type d'anticorps particulier. L'aspect homogène du noyau peut correspondre à la présence d'anticorps anti-chromatine : anti-ADN, anti-nucléosome, anti-histones. L'aspect moucheté du noyau peut correspondre à la présence d'anti-Sm, d'anti-RNP, d'anti-SSA, d'anti-SSB notamment et une fluorescence cytoplasmique à la présence d'anticorps anti-ribosomes. Même si quasiment tous les laboratoires font l'IFI sur Hep2, les conditions (de culture, de fixation des cellules, du conjugué…) ne sont pas consensuelles ; il y a donc une grande variabilité selon les laboratoires. Cette hétérogénéité est aussi retrouvée dans la recherche des spécificités (techniques différentes, nature de l'antigène fixé différente) [27] [28].

D'autres techniques de détection des anti-nucléaires comme le test de « screening » en phase solide (EliA CTD ScreenPhadia™) ont été développées mais ce test, s'il gagne en spécificité, n'est pas aussi sensible [73]. Et l'intérêt de l'IFI est qu'elle est très sensible : selon une étude [42] 95% des lupiques ont des anti-nucléaires positifs (certains patients notamment en cas de déficit en C2 ne développeront pas d'anti-nucléaires [57]), alors que seulement environ 70% ont des anti-ADN positifs à un moment de leur maladie [42]. Les pourcentages sont variables selon les études, ce qui n'est pas étonnant du fait de la diversité des techniques comme nous allons le voir.

Dans de très rares cas les anticorps anti-ADN peuvent être présents alors que les anti-nucléaires sont négatifs, mais ces cas restent anecdotiques (0 à 0,8% [48]). La règle générale est donc de ne rechercher les anticorps anti-ADN que si les anticorps anti-nucléaires sont positifs (recommandations de la NABM (Nomenclature des actes de biologie médicale)) [96].

1.2.2. Les anticorps anti-ADN

A. Les anticorps anti-ADN, leur rôle dans la physiopathologie du lupus

Dix ans après leur découverte (vers 1957 [85]) les anticorps anti-ADN sont retrouvés dans des biopsies rénales de patients atteints de néphrite lupique, rendant probable leur rôle dans le développement de l'atteinte rénale [49]. Mais ils ne sont pas les seuls : d'autres anticorps anti-nucléaires (anti-Ro(SSA), anti-La(SSB) et anti-Sm) ainsi que des anticorps anti-C1q ont été retrouvés dans les reins de patients lupiques [12]. Plus tard il a été montré qu'effectivement les lésions tissulaires rénales sont liées notamment au dépôt de complexes immuns [21] au niveau des glomérules [31].

B. Les différentes cibles des anticorps anti-ADN

a- Structure de l'ADN

Le noyau d'une cellule contient des chromosomes, constitués de fibres de chromatine qui sont elles-mêmes constituées de nucléosomes empilés les uns sur les autres comme des perles sur un fil (« beads on a string ») [29]. Un nucléosome est constitué d'environ 200 paires de bases d'ADN (donc de l'ADN double brin ou bicaténaire) enroulées autour d'un octamère d'histones. Cette structure est aussi appelée ADN natif, différent donc de l'ADN double brin, même si dans la pratique courante on appelle ADN natif l'ADN double brin [90] (figure 2).

b- Anticorps anti-nucléosomes

Selon certaines études le nucléosome serait l'antigène initiateur de la production d'auto-anticorps dans le lupus avant l'ADN double brin et les histones. Cependant, certains patients présentent des anticorps anti-ADN sans anticorps anti-nucléosomes, il y a donc sans doute d'autres mécanismes en cause [12].

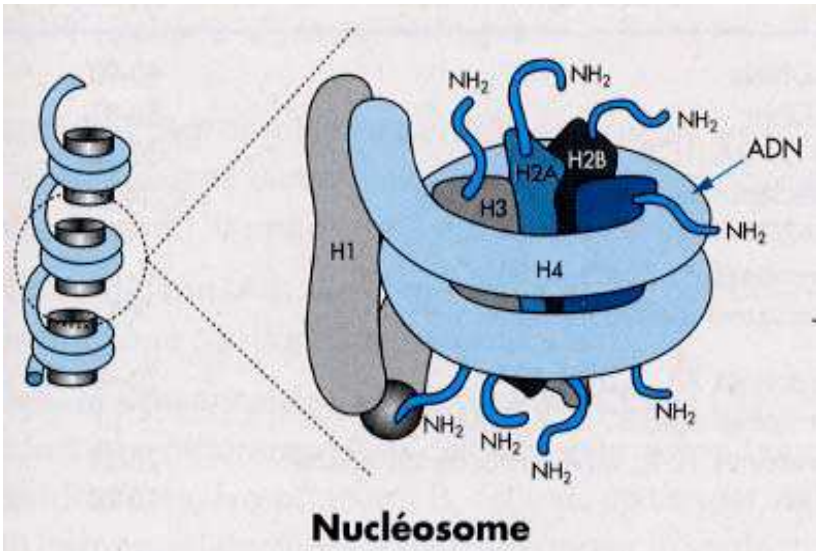


Figure 2 : Structure du nucléosome

Les anticorps anti-nucléosomes sont des anticorps réagissant avec le complexe histones-ADN et pas avec l'ADN seul ou avec les histones seuls. Pour le diagnostic du lupus, selon les études, leur sensibilité varie de 48 à 100% et leur spécificité de 90 à 99% [29]. A des taux élevés, ils sont aussi associés à l'atteinte rénale. Certains auteurs les considèrent même comme plus pertinents que les anticorps anti-ADN double brin [8].

Pourtant, ils ne sont globalement pas plus spécifiques que les anticorps anti-ADN pour le lupus : ils sont retrouvés dans des cas d'hépatites auto-immunes de type 1 et de lupus induit. De plus s'ils sont utiles au diagnostic de lupus et éventuellement de la néphrite lupique, ils ne sont pas indiqués dans le suivi régulier des patients [29].

C'est pourquoi, même si les anticorps anti-nucléosomes ont leur intérêt, ils ne sont pas toujours recherchés en pratique et on leur préfèrera la recherche d'anticorps anti-ADN (notamment double brin). Les anticorps anti-nucléosomes sont surtout utiles, lorsque les anticorps anti-ADN sont négatifs, en cas de suspicion de lupus, de lupus induit ou éventuellement dans le cadre des hépatites auto-immunes de type 1.

c- Anticorps anti-ADN simple brin

L'ADN simple brin est aussi appelé ADN dénaturé, c'est de l'ADN libre. Certains auteurs voient un intérêt dans la recherche de ces anticorps en première intention avant un autre test plus spécifique [64]. En effet, ceux-ci sont très sensibles mais pas spécifiques ce qui exclue leur recherche exclusive. Or certains tests de recherche d'anticorps anti-ADN double brin (db) sont quasiment aussi sensibles mais plus spécifiques [53]. Pour ne pas multiplier les techniques la majorité s'accorde donc à penser que la recherche d'anticorps anti-ADN simple brin ne présente pas d'intérêt en pratique courante.

d- Anticorps anti-ADN double brin

Leur recherche sera privilégiée en pratique car par rapport aux autres, ces anticorps sont assez sensibles, assez spécifiques et utilisables pour le diagnostic et le suivi des patients lupiques comme nous le verrons par la suite.

Selon les tests leur recherche est plus ou moins exclusive. La contamination par de l'ADN simple brin ou la recherche simultanée d'anticorps anti-ADN double brin et simple brin peut se voir notamment par les techniques d'ELISA (« Enzyme linkedimmunosorbentassay ») et dans une moindre mesure pour le test de Farr, ce qui diminue la spécificité de la technique.

Pour la suite de ce mémoire lorsque nous parlerons d'anticorps anti-ADN ce sera des anti-ADN double brin, les autres types d'anti-ADN notamment simple brin (sb) seront spécifiés si besoin.

C. Les techniques de recherche des anticorps anti-ADN

De nombreuses techniques ont été développées au fil des années, certaines ont été abandonnées. Trois principales sont actuellement retenues : le test de Farr, l'ELISA et l'IFI sur *C. luciliae*(*Crithidialuciliae*). Elles seront décrites ci-dessous puis leur sensibilité et leur spécificité seront comparées [90] [16] [42].

a- Test de Farr

C'est une technique de radio-immunologie [13] [78] [105]. De l'ADN marqué par un radio-isotope (Iode 125) est mis en contact avec le sérum du patient. Les anticorps anti-ADN du sérum du patient se fixent sur l'ADN marqué ; ADN db et sb sont séparés en précipitant les immunoglobulines (Ig) avec 50% d'ammonium sulfate saturé ; l'ADN db marqué précipite avec les immunoglobulines du patient alors que l'ADN libre reste dans le surnageant. La radioactivité est ensuite mesurée, elle est proportionnelle au taux d'anticorps anti-ADN du

patient. Les différents isotypes d'anticorps anti-ADN sont mis en évidence sans distinction. Cette technique ancienne et lourde est assez peu utilisée.

b- IFI sur C. luciliae

C. luciliae est un trypanosome parasite de la mouche à viande. Le kinetoplaste de ce protozoaire contient de l'ADN db circulaire sans histones. L'ADN est pur ce qui augmente la spécificité de la technique. Les anticorps anti-ADN sont donc visualisés par une fluorescence au niveau du kinetoplaste, à ne pas confondre avec une fluorescence nucléaire ou une fluorescence du corps basal du flagelle [1] [13].

Par cette technique, des IgG, des IgM ou d'autres isotypes d'anticorps anti-ADN peuvent être mis en évidence.

c- ELISA (« Enzyme linkedimmunosorbentassay »)

De l'ADN double brin est fixé à un support microplaque ; les anticorps anti-ADN du sérum à tester se fixent dessus et sont révélés par un anticorps secondaire. Avant la fixation de l'ADN à la plaque il y a fixation d'un composant intermédiaire (comme la poly L lysine). Cela augmente la sensibilité du test mais le fait perdre en spécificité du fait du risque de fixation non spécifique d'Ig ou de complexes immuns sur ce composant intermédiaire [42] [77].

Comme pour l'IFI C.luciliae par cette technique tous les isotypes d'anticorps anti-ADN peuvent être mis en évidence selon l'anticorps secondaire ajouté.

D. La sensibilité et la spécificité des différentes techniques

a- Test de Farr

Ce test détecte les anticorps de forte avidité très spécifiques du lupus.

Selon des études assez récentes [6] [33] [52] la sensibilité varie de 31,6 à 79,8% elle augmente en cas de lupus actif (66,7 à 90%) ; la spécificité varie de 90,9 à 98% mais diminue en cas de lupus actif (30,6%). Des chiffres comparables sont retrouvés dans de nombreuses études antérieures [48].

Ce test est donc reconnu très spécifique et assez sensible pour le diagnostic de façon consensuelle même si certains en sont toujours de fervents adeptes [52] alors que d'autres le considèrent comme dépassé [64].

b- Test IFI C.luciliae

Ce test détecte les anticorps de forte et de moyenne avidité spécifiques du lupus.

Différentes études [6] [33] [48] [52] retrouvent une sensibilité (se) entre 13 et 55,8% (1 étude isolée retrouve se = 97%) et une spécificité entre 93 et 100%. En cas de lupus actif la sensibilité augmente légèrement : de 16,8 à 18,7% [52] et de 13,2 à 29,2% [33] et la spécificité diminue (85,1%).

Cette technique est donc globalement peu sensible mais très spécifique.

c- ELISA

Pour la technique ELISA les résultats sont moins homogènes entre les différents coffrets commerciaux. Celle-ci a longtemps était considérée comme très sensible et peu spécifique. Cependant selon les coffrets cette affirmation n'est pas toujours vraie.

Les résultats d'une thèse en 2001 [13] comparant 7 trousses de dosage ELISA, pour le diagnostic du lupus, retrouvait :

- pour 4 trousses une sensibilité (se) élevée de 81 à 100% et une spécificité (sp) faible de 15 à 48%

- pour 1 trousse se = 56%, sp = 55%

- pour 2 trousses une spécificité élevée (92 et 63 %) et une sensibilité faible (15 et 43%).

Ces 7 trousses de dosages apparaissent donc comme très hétérogènes.

La sensibilité élevée et la spécificité faible de certains tests peut s'expliquer par la détection des anticorps de faible et de forte affinité. Selon les tests les anticorps de faible affinité seront plus ou moins détectés. Lorsque les anticorps de faible affinité sont éliminés la spécificité des tests augmente.

Ainsi pour plusieurs tests ELISA (PhadiaEliA™, Diastat™, Liaison™) une assez bonne sensibilité et une bonne spécificité sont retrouvées pour le diagnostic (tableau 3). Par contre, ces tests perdent de leur pertinence pour le suivi des patients : la sensibilité augmente globalement mais la spécificité diminue (tableau 3). Nous remarquons qu'entre le diagnostic et le suivi les performances des tests varient ; dans l'ensemble les tests sont plus performants pour le diagnostic.

Une solution pour améliorer les performances des tests dans le suivi des patients serait de changer leur seuil de positivité selon le contexte de leur utilisation : diagnostic ou suivi. Ainsi le changement du seuil de positivité (par la méthode des courbes ROC) pour le suivi des patients lupiques améliore nettement les performances des tests Fidis™ et Farryzyme™ [59]

(tableau 3). Par contre pour les tests Diastat ™ et Liaison™ un changement du seuil de positivité pour obtenir une spécificité à 95% pour le suivi des patients fait chuter drastiquement la sensibilité (tableau 3). Pour ces deux tests un changement de « cut-off » pour le suivi des patients n'est donc pas pertinent.

Une alternative serait d'utiliser un test de dosage des anticorps anti-ADN pour le diagnostic et un autre (plus spécifique) pour le suivi des patients lupiques.

Pour ces 2 approches des renseignements cliniques sur les patients sont par contre nécessaires.

	Diagnostic		Suivi		Suivi après changement du seuil de positivité	
	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
Phadia™ *	39,5 à 73%	93,2 à 97,7%	70,8 à 77,5%	45,6%		
Diastat™	77,8%	86,8%	90%	34,7%	12%	95%
Liaison™	78,6%	84,9%	73,5%	16,3%	10,2%	95%
Fidis™ †			100%	9,8%	83,87%	86,27%
Farryzyme™ ‡			93,6%	62,8%	70,97%	96,1%

Tableau 3 : Résumé de la sensibilité et de la spécificité de différents coffrets d'ELISA en fonction du contexte [6][33] [52] [59]

** Test PhadiaEliA™ : méthode ELISA de nouvelle génération basée sur la détection d'une fluorescence*

† Pour le test Fidis™ : seuil du fabricant à 30IU/mL, nouveau seuil défini par la méthode des courbes ROC 212IU/mL

‡ Pour le test Farryzyme™ : seuil du fabricant à 30IU/mL, nouveau seuil défini par la méthode des courbes ROC 68,8IU/mL.

Sans prendre en compte la clinique du patient, une possibilité est de réaliser une première technique assez sensible puis dans un deuxième temps si besoin une technique plus spécifique. Nous utiliserons par exemple deux techniques ELISA combinées : une des techniques détectant les anticorps anti-ADN de moyenne et de forte affinité et l'autre ne détectant que ceux de forte affinité [16] ou une technique ELISA et une technique par IF C.luciliae [53]. Notons tout de même qu'une seule technique peut être cotée selon la NABM.

E. Les autres paramètres à prendre en compte pour le choix d'une méthode de dosage

Les caractéristiques, avantages et inconvénients des différentes techniques sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	Test de Farr	**IFI *C.luciliae***	**ELISA**
Antigène	ADN purifié ou circulaire en solution (mieux que fixé)	ADN db circulaire	ADN purifié ou circulaire fixé sur microplaque
Sensibilité	+++	++	variable
Spécificité	++++	++++	variable
Reproductibilité même trousse de dosage	Oui	Peu, variabilité lecteurs	Oui
Reproductibilité entre différentes trousses de dosage	Globalement oui	Globalement oui	Non+++
Coût	+++	+	- (automatisation, rapide, simple)
Temps et faisabilité technique	Mauvaise Radioactivité	Mitigé	Oui
Quantification	Oui	Mauvaise Semi-quantitatif	Oui
Affinité des anticorps détectés	Forte affinité	Moyenne et forte affinité	Forte +/- faible affinité
Contamination	ADNsb, autres protéines	Peu ADN pur+++	ADN sb

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des différentes techniques de détection des anticorps anti-ADN

Au vu des caractéristiques mentionnées dans le tableau ci-dessus (reproductibilité pour une même trousse de dosage, moindre coût et temps technique) les méthodes ELISA se développent de plus en plus.

F. Pourquoi de telles différences dans la recherche des anticorps anti-ADN?

a- Très grande variabilité des tests

Comme nous l'avons vu précédemment les principes des trois techniques principales que sont le test de Farr, l'IFI sur C.luciliae et l'ELISA sont très différents. Au-delà de cette hétérogénéité des techniques, il existe aussi une très grande disparité au sein des différents tests par la technique ELISA [28] [13]. Ceci peut être expliqué par la variabilité dans :

- la nature de l'antigène fixé, le plus souvent de l'ADN double brin, comme de l'ADN de thymus de veau, de l'ADN recombinant… et la qualité de la préparation, risque de contamination par de l'ADN sb d'une préparation d'ADN db ; même si la préparation est hautement purifiée, l'ADN db peut se dénaturer spontanément, entrainant des faux positifs ; certains coffrets rechercheront de manière systématique l'ADN sb qui doit être inférieur à un certain seuil (exemple coffret INOVA™) ;

- le tampon et la dilution des sérums ;

- le nombre de calibrants ;

- les temps d'incubation ;

- le conjugué : anticorps mono ou polyclonaux, de différentes origines ;

- le substrat [13] [59] [20] ;

- la valeur seuil.

Un manque de standardisation global est retrouvé même si l'étalonnage est fait par rapport au même standard international (W0 80). Les contrôles qualité externes ont donc pour ce dosage toute leur importance.

Notons qu'étant donné la disparité des tests de dosage d'anticorps anti-ADN, il est recommandé que le patient soit suivi dans le même laboratoire pour que les résultats soient comparables.

b- Anticorps anti-ADN, un groupe très hétérogène

Les anticorps anti-ADN présentent de nombreuses différences en ce qui concerne :

- leur affinité pour l'ADN qui peut varier, les anticorps de forte affinité sont plus spécifiques du lupus mais moins sensibles ;

- leur type : les IgG anti-ADN détectés par ELISA semblent plus spécifiques que les IgM ou les IgA. Cependant, les IgM pourraient avoir leur intérêt [25]. Par ailleurs, au sein des IgG il existe différentes sous-classes ;

- la molécule d'ADN reconnue : au-delà de la différence entre simple et double brin cette molécule présente de nombreux épitopes.

Ainsi, selon les patients et même chez un même individu les anticorps anti-ADN ne sont pas tous identiques. Et chaque méthode ne détecte qu'une partie de ce large spectre.

Une méthode ne peut être exhaustive et la reproductibilité entre les méthodes n'est pas possible totalement. Selon les études on a ainsi par exemple seulement 55% des patients d'une cohorte de lupiques présentant des anticorps anti-ADN par les trois méthodes (ELISA, IF C.luciliae, test de Farr) alors que 87% présentent des anticorps anti-ADN par au moins une méthode [64]. Un laboratoire privilégie la sensibilité ou la spécificité dans le choix de son test, voire fait éventuellement deux techniques complémentaires [53] [64]. Le clinicien doit avoir conscience de la limite des tests et en cas de forte suspicion clinique ne s'arrêtera pas à un résultat négatif.

Par ailleurs, certains anticorps anti-ADN peuvent être retrouvés dans d'autres pathologies telles que le syndrome des anti-phospholipides (lupus en puissance ?), les hépatites auto-immunes, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Gougerot-Sjögren, le syndrome de Sharp. Aucune technique n'est totalement spécifique du lupus [90]. Notons que cela concerne moins de 5% de ces patients : les anticorps anti-ADN ne sont donc pas utiles en pratique dans ces pathologies [48]. Le cas du lupus induit est aussi à souligner. Celui-ci est lié à des médicaments très variés : antibiotiques (minocycline, isoniazide), anti-arythmiques (procaïnamide), beta-bloquant (acebutolol)... Le cas des traitements anti-TNFα (« Tumornecrosis factor α ») tels l'infliximab ou l'etanercept est plus controversé, même si une étude récente les associe au lupus induit [4]. Dans cette étude on constate que les anticorps anti-nucléaires sont souvent présents au cours d'un traitement par anti-TNFα mais on ne parlera de lupus induit qu'en cas de symptômes lupiques, le plus souvent accompagnés d'une augmentation des anticorps anti-ADN. Les anticorps anti-histones quant à eux, sont souvent retrouvés dans les lupus induits mais aussi en cas de lupus : ils ne sont pas spécifiques.

G. Les anticorps anti-ADN, intérêt pour le diagnostic du lupus

La sensibilité du test sera privilégiée.

L'intérêt des anticorps anti-ADN pour le diagnostic du lupus a déjà été évoqué dans la partie sur la sensibilité et la spécificité des différentes techniques, nous revenons ici sur ce sujet

avec une approche plus globale que nous donne une revue exhaustive de la littérature de 2002 [48].

Dans cette revue la pertinence diagnostique des anticorps anti-ADN pour le lupus a été évaluée, sur 168 articles, les 16 plus pertinents donnaient une moyenne de 57,3% pour la sensibilité et de 97,4% pour la spécificité. A partir de ces données des rapports de vraisemblance sur l'intérêt diagnostique des anticorps anti-ADN ont été calculés (tableau 5).

Le rapport de vraisemblance positif (RVP) répond à la question : quel est l'accroissement de la probabilité qu'une personne soit atteinte d'une maladie à la suite d'un test positif?

Le rapport de vraisemblance négatif (RVN) répond à la question : quel est l'accroissement de la probabilité qu'une personne ne soit pas atteinte d'une maladie à la suite d'un test négatif?

Ils se calculent selon les formules suivantes : RVP=se/(1-sp) ; RVN=(1-se)/sp

On définit comme très utile le test si la RVP est >5, la RVN <0,2 ; utile si 2< RVP <ou=5 et 0,2 < RVN ≤0,5 et inutile si RVP ≤2 et RVN >0,5.

Tableau 5 : Définitions et méthodes de calculs des rapports de vraisemblance

Le rapport de vraisemblance négatif (RVN) calculé est de 0,49. Cette valeur définie le dosage des anticorps anti-ADN comme utile pour confirmer l'idée qu'une personne n'est pas atteinte du lupus. Mais elle n'est pas très significative ; des anticorps anti-ADN négatifs n'excluent pas un diagnostic de lupus.

Le rapport de vraisemblance positif (RVP) par contre est très pertinent puisqu'il est > 10. Cette valeur définie le dosage des anticorps anti-ADN comme très utile pour confirmer l'idée qu'une personne est atteinte du lupus. Notons, comme nous le souligne une revue de la littérature de 2002 [96] qu'il est important d'avoir des signes cliniques en faveur d'un lupus, c'est-à dire une probabilité pré-test suffisante.

Les anticorps anti-ADN ont donc tout leur intérêt dans le diagnostic du lupus ; ils font d'ailleurs partie des critères de diagnostic selon l'ACR (cf 1.1.2.) ; cependant la méthode n'est pas spécifiée et comme nous l'avons vu elle influence considérablement le résultat.

H. Les anticorps anti-ADN, intérêt pour le suivi du lupus

La spécificité du test sera privilégiée.

Pour le suivi du lupus, l'intérêt des anticorps anti-ADN a aussi déjà été évoqué dans la partie sur la sensibilité et la spécificité des différentes techniques, mais pour une approche plus

globale sur le sujet nous exposerons les résultats de la revue de la littérature déjà citée pour le diagnostic [48].

En moyenne, sur 23 études sélectionnées pour leur pertinence la sensibilité est de 66% et la spécificité de 66%. Mais, entre les études il existe une grande variabilité de résultats. Cette hétérogénéité n'est pas surprenante étant donné la disparité des techniques comme nous l'avons vu. De plus, les études diffèrent parfois sur la définition précise d'un lupus actif (certaines incluant les anti-ADN), la prise ou non d'un traitement par le patient ...

Le RVP moyen est de 4,14 ce qui évalue la recherche des anticorps anti-ADN comme utile (entre 2 et 5). Ainsi en prenant en compte les autres éléments cliniques et biologiques de détermination de l'activité du lupus, des anticorps anti-ADN positifs n'augmentent que modérément la probabilité d'un lupus actif. Le lien est moins fort que pour le diagnostic. D'ailleurs, dans plusieurs études, des patients lupiques en rémission présentent fréquemment des anticorps anti-ADN élevés de façon persistante. Par contre, selon la majorité des études des taux élevés d'anticorps anti-ADN augmentent la spécificité du test pour le lupus actif.

Dans cette revue, le RVN moyen est de 0,51, ce qui donne peu de valeur aux anti-ADN négatifs pour exclure un lupus actif.

D'autre part cette même revue de la littérature ne retrouve pas la présence d'anti-ADN comme prédictive d'une poussée à venir [48]. A l'inverse certaines études [34] [56] ont montré que les anticorps anti-ADN pouvaient chuter juste avant une poussée, phénomène qui serait expliqué par le dépôt de ces anticorps dans les tissus et par leur fuite urinaire en cas d'atteinte rénale.

Pour ce qui est de la néphrite lupique certaines études ont montré une corrélation avec les anticorps anti-ADN [24] [42] [81] mais le lien n'est pas spécifique. Dans la revue de la littérature présentée [48] sur 8 études sélectionnées on retrouve une sensibilité de 0,65, une spécificité de 0,41, un RVP de 1,7 et un RVN de 0,76. Les anticorps anti-ADN ne sont donc pas pertinents pour détecter la néphrite lupique ; l'association des anticorps anti-C1q et anti-ADN semble déjà plus fructueuse [60].

En pratique un clinicien ne modifiera pas un traitement devant une variation des anticorps anti-ADN, il rapprochera éventuellement le suivi, mais se fiera plus à la clinique. Il existe donc un besoin important de nouveaux marqueurs pour cette pathologie à l'évolution imprédictible et parfois dangereuse. Une association de plusieurs marqueurs (comme on commence déjà à le faire [60] [91] permettra sans doute de suivre l'évolutivité de la manière la plus précise possible.

1.2.3. Les autres anticorps anti-nucléaires retrouvés chez les patients lupiques

A. Les anticorps anti-Sm

Les anticorps anti-Sm sont dirigés contre de multiples antigènes correspondant à des polypeptides présents dans les « smallnuclearribonucleoprotein». Ceux-ci participent à l'épissage de l'ARN messager dans le noyau. Les anticorps anti-Sm doivent leur nom au patient chez qui ils ont été mis en évidence pour la première fois en 1966 : monsieur Smith. Ils ont une sensibilité faible, détectables chez 5 à 30% des patients lupiques [68] mais une bonne spécificité pour le lupus et, contrairement aux anticorps anti-ADN, ils persistent dans le temps même en cas de rémission. Ils font d'ailleurs partie des critères diagnostiques de l'ACR du lupus [35]. Ils sont quasiment toujours associés aux anticorps anti-RNP. Par ailleurs on retrouve des anticorps anti-RNP chez 25 à 47% des patients lupiques ; ils sont par contre moins spécifiques [20] ; de forts taux d'anticorps anti-RNP sont associés au diagnostic de connectivite mixte.

B. Les anticorps anti-SSA SSB

Les anticorps anti-SSA (ou Ro) et anti-SSB (ou La) ne sont pas spécifiques du lupus mais sont utiles lorsque les anticorps anti-ADN sont absents. On les retrouve aussi dans le syndrome de GougerotSjögren. Chez la femme enceinte les anti-SSA peuvent être associés à un bloc cardiaque congénital pour le bébé [20].

C. Les anticorps anti-histones

Comme nous l'avons vu plus haut les histones sont des composants du nucléosome ; on parlera d'anticorps anti-histones pour les anticorps dirigés contre les épitopes présents sur un nucléosome constitué et contre les épitopes présents lorsque les histones sont dénaturés [29]. On les retrouve dans le lupus (50 à 80% des patients) mais ils ne sont pas spécifiques. Ils sont retrouvés fréquemment dans le lupus induit [47] [20], parfois dans d'autres pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde.

D. Les anticorps anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

Cet anticorps a été décrit pour la première fois en 1978 [69]. Il est dirigé contre une protéine de l'ADN polymérase. Il est mis en évidence par IFI sur cellule Hep2 puis éventuellement confirmé par double immunodiffusion. Il est assez spécifique du lupus, surtout à des titres

élevés. Cependant souvent d'autres anticorps anti-nucléaires masquent sa présence sur l'IFI Hep2 [58].

E. Les anticorps anti-ribosomes

Les anticorps anti-ribosomes forment un groupe hétérogène avec des cibles antigéniques multiples. Ils se caractérisent par une fluorescence cytoplasmique en IF sur cellules Hep2 ou sur coupe de foie, de rein, d'estomac ou de pancréas de rat. Ils sont peu sensibles et pas très spécifiques du lupus : environ 33 % sont présents dans d'autres pathologies (affections auto-immunes, cancers) [43]. Les anticorps dirigés contre les protéines ribosomales P sont plus spécifiques. Cette spécificité est recherchée par western blot et par immunodot.

1.3. Le complément

1.3.1 Présentation générale

A. Le fonctionnement global

Le système du complément est un système de l'immunité innée, en interface avec l'immunité adaptative. Il est en première ligne de défense contre les micro-organismes mais joue aussi un rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques. Il est composé d'environ 35 protéines principalement plasmatiques. Le complément circulant est sous forme non activé.

Il existe trois voies d'activation qui par une série de réactions enzymatiques en cascade mènent à la formation de C3 convertases : C4bC2a pour la voie classique et la voie des lectines et C3bBb pour la voie alterne. Ces C3 convertases clivent C3. C3 est le composant central du complément et la plus abondante des protéines sériques du complément. Ce clivage mène notamment à la production de fragments C3b. Ceux-ci ont un rôle d'opsonisation des pathogènes ou des cellules hôtes. Ils mènent aussi à la formation d'une C5 convertase ; celle-ci par une succession d'activations des composants C6 à C9 permet d'aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire (figure3). A tous les niveaux la cascade du complément est régulée par de nombreuses protéines.

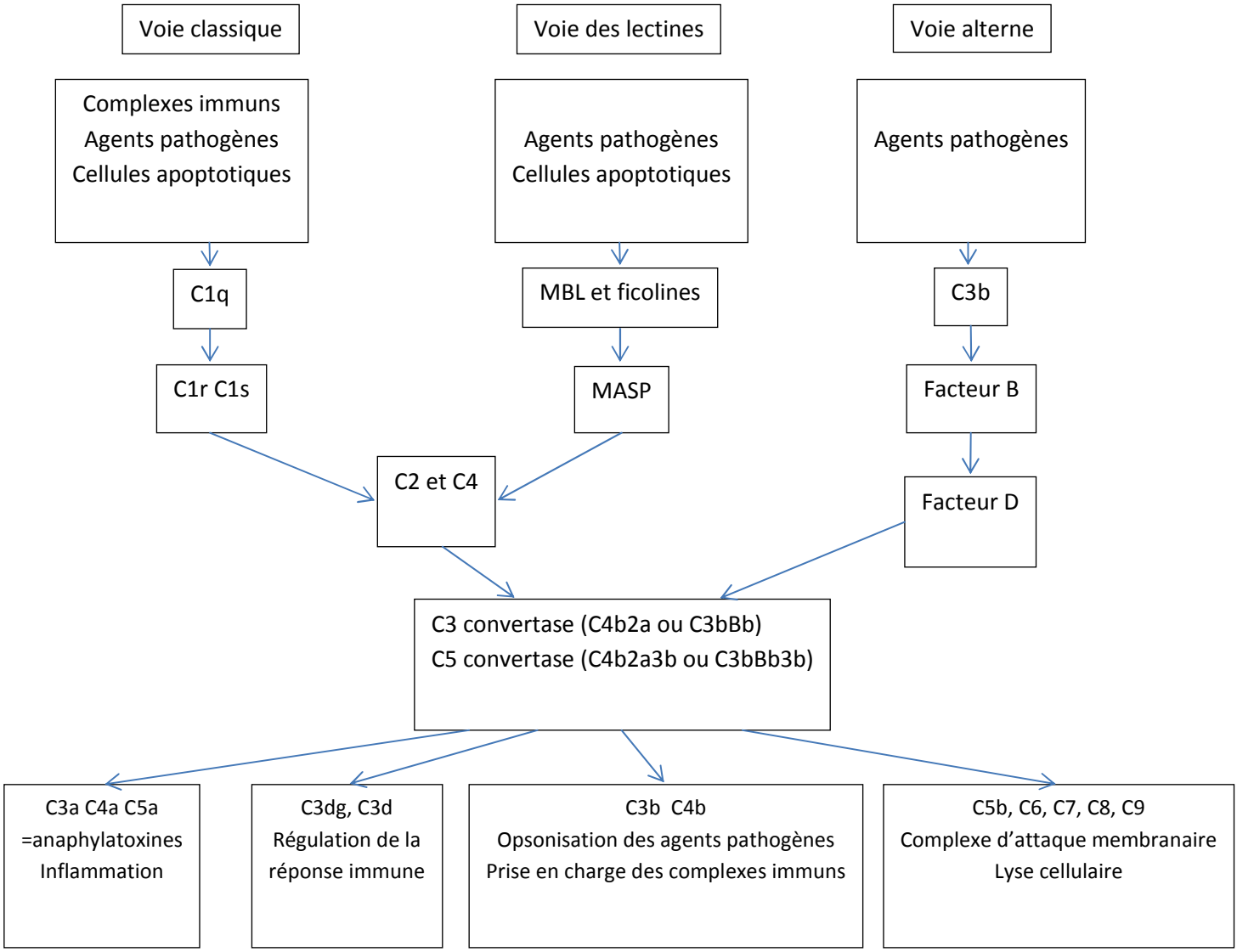


Figure 3 : Les différentes voies d'activation du complément

B. La voie classique

Sa protéine de reconnaissance est le C1q ; il reconnait les IgG et IgM de complexes immuns, des agents pathogènes, certaines protéines comme la CRP et les cellules apoptotiques. Le C1q est lié aux protéases à sérine C1r et C1s qui déclenchent la cascade d'activation du complément. Le C1 inhibiteur bloque l'activité de C1r et de C1s. Cette voie est calcium et magnésium dépendante.

C. La voie des lectines

Ses protéines de reconnaissance sont la MBL (« Mannose-bindinglectin ») et les ficolines qui se lient aux carbohydrates d'agents pathogènes et de cellules apoptotiques. Elles circulent en association avec les MASP (« MBL associated serine proteases ») équivalents aux C1r et C1s de la voie classique et qui permettent l'activation de la cascade du complément. Cette voie est calcium dépendante.

D. La voie alterne

Cette voie s'active par un clivage spontané de C3, suivi d'une interaction avec les facteurs B et D. Le C3b a notamment un rôle d'opsonisation des micro-organismes. Elle est régulée par la properdine qui a un rôle principalement activateur mais peut être aussi inhibiteur [98]. Cette voie est magnésium dépendante.

1.3.2 Implication dans la physiopathologie du lupus

A. Les effets néfastes du complément

a- Réponse inflammatoire

L'activation du complément se fait normalement en réponse à l'intrusion d'agents pathogènes (ou par les cellules apoptotiques) mais en cas de lupus elle est déclenchée par des antigènes du soi notamment nucléaires. Cette activation induit une réponse inflammatoire globale de l'organisme. Cette réponse inflammatoire est déclenchée entre autres par des anaphylatoxines : ce sont les fragments C3a, C4a et C5a, produits lors du clivage de C3, C4 et C5. L'activation des macrophages, granulocytes et mastocytes par la fixation des complexes C3b-antigène participe aussi à la réponse inflammatoire.

b-Dommages tissulaires

Selon les modèles animaux la glomérulonéphrite lupique est initiée par dépôt ou formation de complexes immuns dans le rein ce qui provoque l'activation du complément (formation du complexe d'attaque membranaire…) [12].Sur ces modèles animaux l'activation de la voie alterne notamment est cause de lésions rénales.

Dans les reins de patients atteints de néphrite lupique on retrouve en immunofluorescence des dépôts de composants des trois voies d'activation du complément. Ces dépôts (de properdine entre autres) pourraient être un indice d'activité histologique de la néphrite lupique [83].

Cependant des patients lupiques présentent des dépôts de complexes immuns et même des lésions de glomérulonéphrite à l'histologie sans jamais développer d'atteinte rénale clinique. Il existe donc d'autres facteurs impliqués dans l'évolution vers l'atteinte clinique [15] [30] [101].

B. Les effets protecteurs du complément

a-Déficit en complément et prédisposition au lupus

Les déficits en complément peuvent concerner à peu près tous ses composants ; ils sont globalement rares. Ils peuvent être associés à différentes manifestations cliniques notamment des infections, comme c'est le cas pour les déficits en C1q, C1r, C1s, C2 et C4.

Mais, en dehors du risque infectieux, le déficit homozygote en C1, dans une moindre mesure en C2 et à une encore plus faible fréquence en C4 constitue un facteur de risque de développer un lupus. Ainsi plus de 90% des personnes déficitaires en C1q et C1r/C1s développent une pathologie équivalente au lupus alors que seulement 10 à 20% des personnes déficitaires en C2 développeront un lupus [98]. En cas de déficit en C1 ou en C4 le lupus concerne les hommes et les femmes avec la même incidence et commence habituellement tôt dans la vie, alors qu'en cas de déficit en C2 les femmes sont plus atteintes que les hommes et développent un lupus plus tardivement [98].

Les déficits en composants précoces de la voie classique sont un facteur de risque de lupus mais pas d'autres maladies auto-immunes [87]. Cela nous conforte dans l'idée que le complément est impliqué dans la physiopathologie du lupus.

En dehors des déficits génétiques qui ne sont pas la majorité des cas, lors des poussées de la maladie les patients lupiques présentent un déficit fonctionnel en protéines du complément, lié à son activation et donc à sa consommation. Ce déficit, à défaut d'être à l'origine de la maladie, pourrait l'auto-entretenir par les mêmes mécanismes.

b- Prise en charge des complexes immuns

Comme nous l'avons vu plus haut, dans les organes cibles du lupus, notamment le rein, un dépôt de complexes immuns est observé. Or le complément a un rôle de solubilisation et d'élimination des complexes immuns en les recouvrant de C3b [94] [76].

En effet les C3b liés aux complexes immuns se fixent au récepteur CR1 (« Complementreceptor 1 ») situés sur les érythrocytes, ce qui permet le transport de ces complexes dans la circulation et leur élimination dans la rate. Dans les années 80 il a été montré que la consommation du complément pendant les poussées lupiques induisait une diminution du récepteur CR1 [39]. L'hypothèse est que ces récepteurs seraient « saturés » par les complexes immuns et donc artificiellement diminués.

c- Induction de la tolérance immune

Le complément favorise l'élimination des lymphocytes auto-réactifs [98] [14]. Il présente des antigènes du soi aux lymphocytes B spécifiques de ces antigènes, ce qui induit l'élimination de ces lymphocytes.

Ainsi, en cas de déficit en complément, les lymphocytes B auto-réactifs arrivent plus facilement à maturation et peuvent reconnaître les auto-antigènes du lupus et induire une réponse immunitaire.

d- Elimination des cellules apoptotiques

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est très fréquente dans l'organisme tout au long de la vie et est utile au maintien de l'homéostasie tissulaire. Les cellules apoptotiques sont opsonisées par le C1q, la MBL, les ficolines (L et H) mais aussi les pentraxines (C-reactive-protein, serumamyloid P component ...) et les IgM [98]. Cette reconnaissance permet une phagocytose physiologique.

Par contre, en cas de déficit dans ces molécules de reconnaissance, la cellule n'est pas bien prise en charge et on observe une nécrose inflammatoire de celle-ci et un relargage des composants du noyau qui deviennent des cibles pour d'éventuels auto-anticorps (figure 4). Ces conclusions ont été permises par l'étude de souris «knock-out» pour une molécule de reconnaissance (tableau 5) [23] et les constatations faites chez les patients ayant un déficit génétique en certaines molécules.

Dans le même ordre d'idée l'augmentation de l'apoptose (exposition aux ultra-violets par exemple) pourrait favoriser l'exposition des antigènes nucléaires au système immunitaire. Cette augmentation de l'apoptose pourrait aussi être liée à l'altération de protéines/gènes comme Fas ou Bcl-2 (accélération de l'apoptose des cellules circulantes). Ce mécanisme

semble avoir un impact important dans le développement des auto-anticorps anti-nucléaires du lupus. Sa meilleure connaissance pourrait permettre de cibler les thérapeutiques [54].

Molecule	Phenotype of knock-out mice	References
C1q	Systemic autoimmunity with autoantibodies and glomerulonephritis Increased numbers of apoptotic cells in glomeruli (in kidneys) Delayed clearance of apoptotic cells from peritoneal cavity	Taylor et al. (2000), Botto et al. (1998), Quartier et al. (2005), Nauta et al. (2002), Castellano et al. (2004), Ogden et al. (2001), Vandivier et al. (2002)
C3	No (enhanced) autoantibody response against chromatin No autoimmune disease	Sekine et al. (2001), Einav et al. (2002)
C4	Systemic autoimmunity with autoantibodies and glomerulonephritis Delayed clearance of apoptotic cells from peritoneal cavity	Taylor et al. (2000), Chen et al. (2000)
SAP	Systemic autoimmunity with autoantibodies and glomerulonephritis Enhanced immune response against chromatin	Bickerstaff et al. (1999), Nauta et al. (2003b)
MBL	Decreased clearance of apoptotic cells No autoimmune disease	Stuart et al. (2005), Bijl et al. (2003)
IgM	Immune response against nuclear antigens Decreased clearance of apoptotic cells	Quartier et al. (2005), Ehrenstein et al. (2000), Boes et al. (2000)

Adapted from Roos et al. (2004).

Tableau 5 : Phénotypes de souris déficitaires en molécules de l'immunité innée[23]

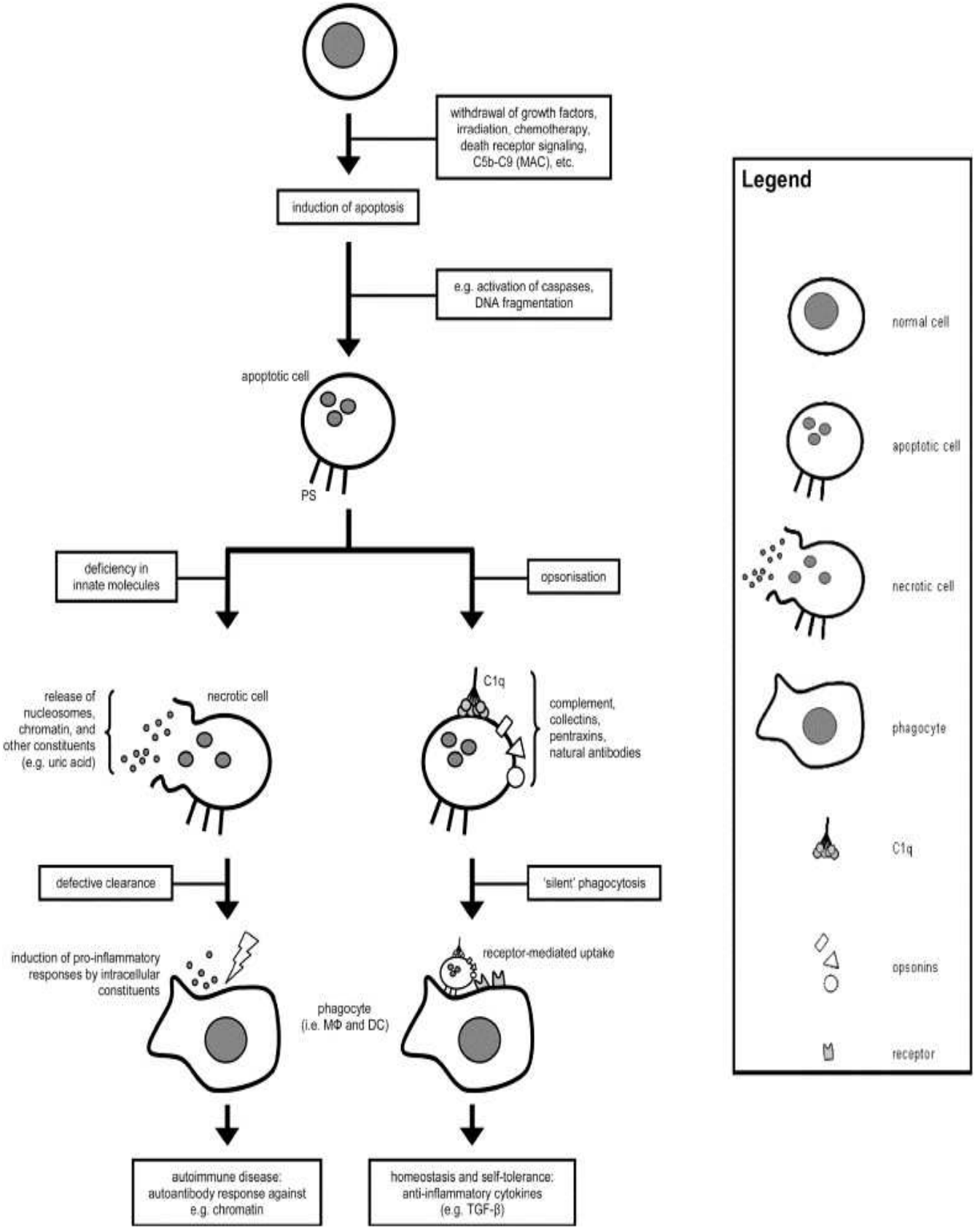


Figure 4 : Induction de l'apoptose et élimination des cellules apoptotiques[23]

e- Contrôle de la production des cytokines

Le déficit en C1q pourrait modifier la production des cytokines [106]. Or les interferons de type 1 notamment sont des cytokines qui jouent un rôle important dans la physiopathologie du lupus [12], [75]. Ils y sont impliqués par de nombreux aspects (positifs ou négatifs) ; la réponse anti-virale en est un, l'infection virale étant possiblement un agent étiologique du lupus. Ainsi le C1q jouerait un rôle protecteur contre le lupus en régulant la production des cytokines.

1.3.3. CH50, C3, C4, CIC

En cas de poussée lupique le système du complément est activé, ses composants sont consommés ce qui peut amener à un déficit partiel ou à une dysfonction. Une diminution du C3, C4 et / ou du CH50 (test hémolytique fonctionnel d'activation de la voie classique du complément) peut donc signifier une maladie active. De même le retour à la normale de ces paramètres sera un signe biologique d'amélioration.

Pour le diagnostic de lupus une diminution de C3, C4 et / ou CH50 associée à d'autres critères cliniques et biologiques sera aussi un argument en plus. Sachant que cette diminution n'est pas spécifique et est à interpréter en fonction du contexte. Ces signes biologiques d'activation du complément existent chez 40 à 60% des patients lupiques [54] [104]. Ces déficits transitoires en complément sont bien sûr à distinguer des déficits génétiques que nous avons évoqués plus haut.

En cas de poussée il est aussi possible de mettre en évidence une élévation des complexes immuns circulants (CIC). Ceux-ci ne sont pas spécifiques du lupus et peuvent être retrouvés notamment dans d'autres maladies auto-immunes.

1.3.4. Les anticorps anti-C1q

Les anticorps anti-C1q ont été décrits pour la première fois en 1984 [99]. Depuis 2007 leur recherche est recommandée par «the EuropeanLeagueAgainstRheumatism» pour le diagnostic et le suivi des patients lupiques [7]. On les retrouve principalement chez ces patients (environ 20 à 40% des malades atteints de lupus présentent des anticorps anti-C1q [104]) et en cas de vascularite urticariennehypocomplémentémique, plus rarement dans d'autres cas [84]. Ce marqueur n'est donc pas spécifique du lupus [46].

Le C1q est constitué d'une partie collagène effectrice et de plusieurs têtes globulaires de reconnaissance formant comme un bouquet de tulipes. Les anticorps anti-C1q recherchés en routine sont dirigés contre la partie collagène du C1q. Le complexe immun C1q-anti-C1q active la voie classique du complément (par l'intermédiaire d'un autre C1q). Ce phénomène provoque des lésions tissulaires notamment dans le rein.

Récemment on a pu mettre en évidence que certains anticorps anti-C1q, dirigés contre sa tête globulaire [80], inhibait l'interaction du C1q avec les IgG des complexes immuns et la CRP. Ainsi certains anticorps anti-C1q pourrait provoquer un déficit fonctionnel en C1q, ce qui induirait un défaut d'élimination des cellules apoptotiques et des complexes immuns par C1q [12].

La signification clinique des anticorps anti-C1q reste controversée. Malgré une valeur prédictive positive parfois limite (50% [65]), la plupart des auteurs les associent à la néphrite lupique [3] [65] [97]. Certains les considèrent même prédictifs d'une poussée rénale dans les 6 mois [45] [65] [79].

Cependant dans une étude japonaise prospective (sur 2ans) longitudinale parue en 2011 et incluant 126 patients [46] on conclue que les anticorps anti-C1q sont associés ($p < 0,0001$) à l'activité lupique globale (SLEDAI-2K) et aux marqueurs biologiques du lupus (anticorps anti-ADN, C3, C4, CH50, CIC) mais pas à la néphrite lupique active ($p=0,462$). Notons qu'il est reproché à cette étude un trop faible nombre de néphrites lupiques actives pour conclure [97].

Les différentes études sont par contre en accord sur le fait que les anticorps anti-C1q ont une bonne valeur prédictive négative (87%) [46) [65] [79] pour la néphrite lupique active, et qu'ils décroissent significativement avec l'amélioration clinique sous traitement. Ainsi pour les patients positifs en anticorps anti-C1q, le suivi de cet anticorps est un bon marqueur d'efficacité du traitement. Par ailleurs une étude [44] semble mettre en évidence une très bonne valeur prédictive négative des anti-C1q pour la nécrose glomérulaire ; ainsi les anticorps anti-C1q seraient plus spécifiques d'un type de lésion histologique.

1.3.5. La MBL et les ficolines

A. La MBL

Comme nous l'avons vu plus haut une mauvaise élimination des cellules apoptotiques participerait à la physiopathologie du lupus. Or la MBL reconnaît les débris de cellules apoptotiques et est impliquée dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages.

On pourrait donc penser que, comme pour les déficits en composants précoces de la voie classique, les déficits en MBL prédisposeraient au lupus. C'est le cas selon certaines études (notamment par polymorphisme du gène MBL-2) mais ce point reste très controversé [98] [70]. Il est par contre admis que dans certains cas les déficits en MBL, associés à d'autres facteurs, augmentent la susceptibilité aux infections voire aux évènements cardio-vasculaires [98].

Notons par ailleurs que les taux bas de MBL observés chez des lupiques pourraient être attribués non pas à un déficit constitutionnel mais à des anticorps anti-MBL ou à une consommation de la MBL. Cependant, dans l'état actuel des connaissances, des anticorps anti-MBL ont été mis en évidence chez des patients lupiques mais sans corrélation avec le titre de MBL [95].

B. Les ficolines

Actuellement trois ficolines ont été mise en évidence : la ficoline M (ou 1), la ficoline L (ou 2) et la ficoline H (ou 3).

Au sujet de la ficoline M il n'y a pas de données permettant de la mettre en lien avec le lupus.

Comme la MBL, la ficoline L a la capacité de se lier aux cellules apoptotiques, elle pourrait donc être impliquée dans la physiopathologie du lupus [61]. Selon une étude japonaise parue en 2012 [102] les taux de ficoline L sont plus bas chez les patients lupiques que les individus sains (5 µg/ml versus 8,7µg/ml, p= 0,0001). Notons que des taux bas de ficoline L ne sont pas associés au SLEDAI mais à la thrombopénie chez les patients lupiques [102].

En ce qui concerne la ficoline H nous l'étudierons plus particulièrement dans la prochaine partie.

2. La ficoline H

2.1. Circonstance de découverte

La ficoline H (Hakata antigène) fut mise en évidence pour la première fois en 1978 [40] puis caractérisée dans les années 1990 [41]. Son nom est l'ancien nom de Fukuoka City où elle a été découverte. Cette protéine a été découverte par l'intermédiaire de son anticorps présent chez des patients lupiques dont les sérums réagissaient avec les sérums de patients sains [41].

En 1996 [107] on prouve que ces anticorps sont des auto-anticorps, mais on ne les trouve que chez une faible proportion de patients lupiques, la sensibilité de la méthode étant peut-être à mettre en cause.

2.2. Présentation générale

La ficoline H est synthétisée et sécrétée par les hépatocytes, les cellules du tractus biliaire et les cellules bronchiques et alvéolaires [2].

Comme la ficoline L, la ficoline M et la MBL,la ficoline H active la voie des lectines[62].

La ficoline H se lie notamment au GlcNac, au GalNAc et au D-fucose mais pas au mannose ou au lactose. La MBL et chaque ficoline ont des spécificités de reconnaissance des sucres différentes [109]. Le tableau ci-dessous (tableau 6) récapitule les différents ligands reconnus par C1q, la MBL et les ficolines (appelés aussi les « collagènes de défense » du fait de leur structure comparable à celle du collagène).

La ficoline H se lie à la BSA (« Bovine serumalbumin ») acétylée de façon dépendante du calcium, comme nous le montre l'inhibition de l'interaction par l'EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique). De plus un site de liaison au calcium se trouve au niveau de son domaine de reconnaissance [26]. Cette liaison est inhibée par de fortes concentrations de sel ce qui est en faveur d'un rôle important des interactions ioniques dans la liaison de la ficoline H avec les groupes acétylés.

La liaison avec une bactérie telle *Aerococcusviridans*est plus complexe et ne semble pas totalement calcium dépendante. Les molécules N-acétylées telle la N-acetylgalactosamine et la N-acetylglucosamine peuvent inhiber l'interaction de la ficoline H avec certains ligands [108].

Par ailleurs c'est la plus petite des 3 ficolines humaines (figure 5). Mais son gène (FCN3) situé sur le chromosome 1 [36] est le plus exprimé parmi les ficolineset elle a la plus forte concentration. Les concentrations sont : pour la MBL et la ficoline M de 0,8 µg/ml, pour la ficoline L de 3,7 à 8,7 µg/ml et pour la ficoline H de 18,4 à 32,4µg/ml [9].Elle a aussi la plus grande capacité d'activation du complément et une résistance aux collagénases (que n'ont pas les autres) [38].

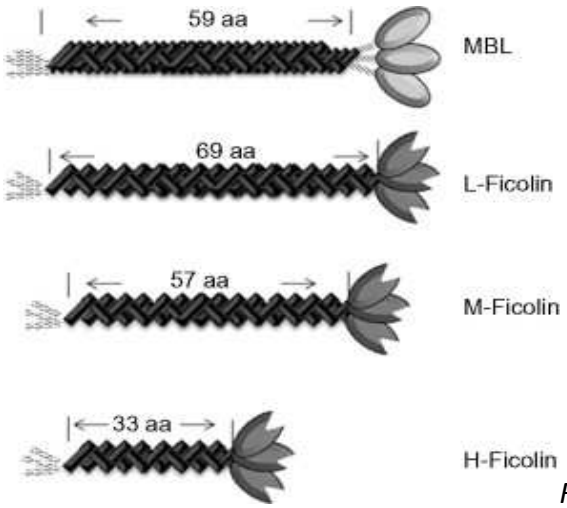


Figure 5 : Structure trimérique de la MBL et des ficolines[9]

	Sucres	Acides nucléiques	Lipides	Protéines
C1q	GlcNAc deoxyribose heparine	ADN ARN	LPS PS Lipide A	Porines bactériennes glycoprotéines virales **IgG**, **IgM, gC1qR** **PTX3, CRP, SAP,PrP**
MBL	mannose, GlcNAc glucose, L-fucose	ADN ARN		**agal. Ig**, **PTX3**, **SAP** glycoprotéines virales Porines bactériennes
L-ficolin	GlcNAc, b-glucane CPS bactériennes groupes Ac, heparine	ADN	LTA	**PTX3, CRP** **PTX3, CRP**
H-ficolin	Gal, D-fucose PSA, groupes Ac		LPS	
M-ficolin	groupes Ac (GlcNAc, GalNAc, acide sialique)			**PTX3, CRP**

Tableau 6 : Ligands des « collagènes de défense »[3] [55][93]

Ac : Acétyle, ADN : Acide désoxyribonucléique, AgalIg : Immunoglobuline agalactosilée, ARN : Acide ribonucléique, CPS : Capsule polysaccharidique, CRP : « C-reactiveprotein », Gal : Galactose, GalNAc : N-acetylgalactosamine, gC1qR : Récepteur des têtes globulaires de C1q, GlcNac : N-acétyle glucosamine, LPS : Lipopolysaccharide, PrP : plasma riche en plaquettes, PSA : Polysaccharide, PS : Phosphatidylsérine, PTX3 : Pentraxine3, SAP : « Serumamyloïd P-component ».

2.3. Concentration variable chez les patients lupiques

En général les patients lupiques présentent des taux élevés de ficoline H (56.1 µg/ml versus 18,4 à 32.4 µg/ml dans la population générale) [5] ; ceux-ci ne sont pas clairement associés à l'activité de la maladie [5] et la ficoline H est au contraire abaissée ou absente chez environ 5% des patients lupiques [36]. Par ailleurs certains patients présentant des infections à répétition sont aussi déficitaires en ficoline H [5] [36] [67].

2.4. Analogie avec C1q et MBL

Les ficolines font partie de la famille des collectines, avec la MBL. La structure des ficolines est très proche de celle du C1q et de la MBL (figure 5 et 7).

Les trois ont un domaine de reconnaissance par des têtes globulaires en C-terminal. La reconnaissance se fait pour les ficolines par un domaine « fibrinogenlike » (FBG) -car proche des chaînes beta et gamma du fibrinogène- et pour la MBL par les CRD (C-type (Calcium dépendant) carbohydrate recognition domain).

Par ailleurs le C1q, la MBL et les ficolines ont tous en N-terminal un domaine collagène effecteur.

Pour la MBL et les ficolines trois têtes globulaires sont reliées à une triple hélice « collagen-like » (le tout correspond à 3 chaînes polypeptidiques identiques) ; jusqu'à 4 ou 6 triples hélices peuvent se joindre ensemble (figure 6).

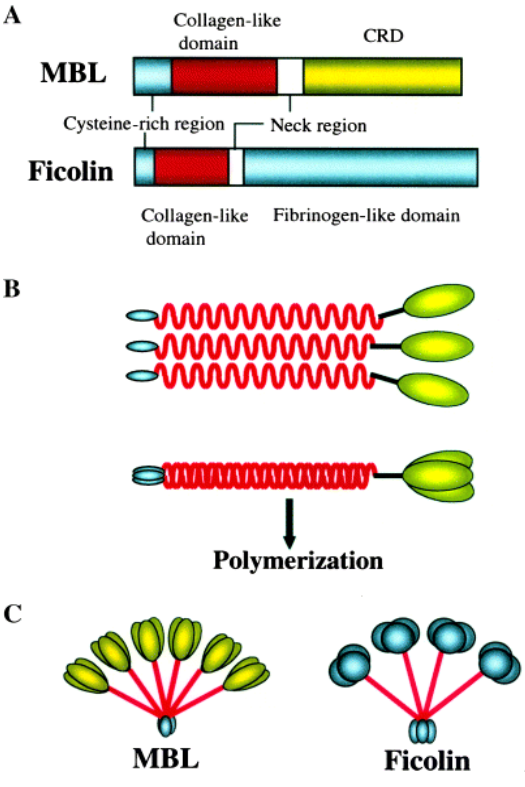


Figure 6 : Structure de la MBL et des ficolines[3]

Le domaine « collagen-like » est assez similaire pour la MBL et les ficolines. Cela n'est pas étonnant étant donné que, au moins pour la MBL et les ficolines L et H, les mêmes molécules effectrices s'y lient : les MASP (figure 8) et leurs protéines tronquées : les sMAP (« small MBL associatedprotein ») et les MAp44 [63].

Pour le C1q il existe aussi des chaînes polypeptidiques mais elles sont différentes. Les molécules effectrices sont le C1r et le C1s.

La structure des MASP est identique à celle des C1r et C1s de même que leur activation [36].

De plus, les structures tertiaires du C1q, de la MBL et des ficolines sont proches [55].

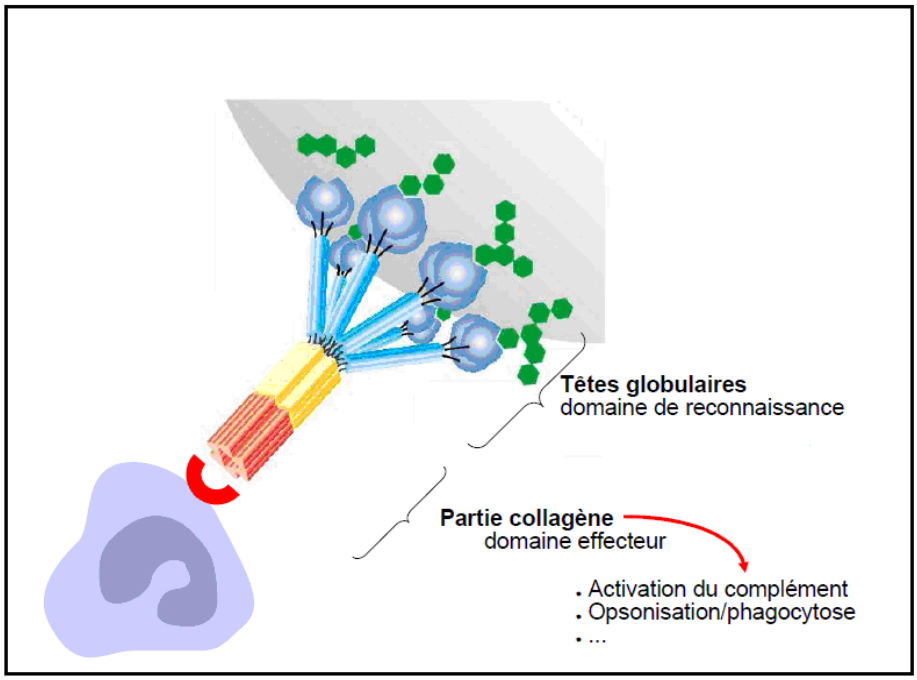


Figure 7 : Représentation schématique des C1q, MBL et ficolines[18]

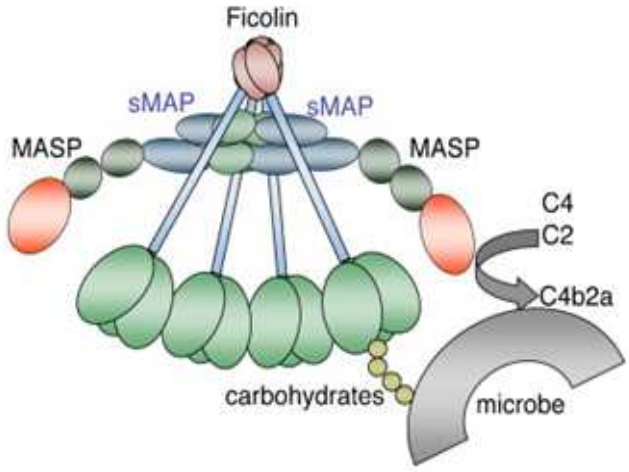


Figure 8 : Les MASP, protéases effectrices des ficolines [22]

Ainsi le C1q, la MBL et les ficolines sont comparables par leur structure et leur fonctionnement. Or on a montré le rôle du C1q et des anticorps anti-C1q dans le lupus ainsi que celui moins clair de la MBL et des anticorps anti-MBL, le rôle des ficolines et des anticorps anti-ficolines mérite donc d'être approfondi.

2.5. Rôle anti-infectieux limité et concentration importante

Parmi les protéines de reconnaissance de la voie des lectines, la MBL et la ficolineL reconnaissent de nombreux agents pathogènes. Ainsi la MBL reconnaît notamment des variants du Staphylocoque doré, la ficoline L des Staphylocoques dorés et des Streptocoques pneumoniae encapsulés.

A la différence de ces deux molécules il n'a pas été mis en évidence beaucoup de cibles infectieuses pour la ficoline H (dans une étude un type d'Aerococcusviridans [50] [108] et récemmentle virus influenza A [100]). La ficoline H est capable d'agglutiner des érythrocytes recouverts de lipopolysaccharides de salmonelles et peut aussi se fixer aux lipopolysaccharides d'Hafniaalvei [92], mais dans ces deux cas il n'a pas été possible de mettre en évidence une liaison de la ficoline H avec la bactérie entière [89] [108].

	Bacteries	Levures et champignons	Parasites	Virus	Cellules apoptotiques
C1q	Gram+ Gram-	?	protozoaires	VIH EBV HSV-1	✓
MBL	Gram+ Gram- Mycobacteries	*Candida albicans Saccharomyces cerevisiae Aspergillusfumigatus*	*Trypanosomacruzi*	VIH IAV HSV-2 HBV	✓
Ficoline L	Gram+ Gram-	*Aspergillus fumigatus*	*Trypanosomacruzi*	VHC ?	✓
Ficoline H	Gram-	?	?	Influenza A?	✓
Ficoline M	Gram+ Gram-	?	?	?	?

Tableau 7 : Cibles des « collagènes de défense »[3] [55] [93] [100]

VIH : virus de l'immunodéficience humaine, EBV : Epstein Barr virus, HSV : Herpès simplex virus, IAV : Influenza virus type A, VHC : virus de l'hépatite C.

De même, comme nous le montre le tableau 7, la ficoline H, contrairement à la ficoline L, à la MBL ou au C1q n'a pas de cibles connues pour les champignons ou les parasites.

Pourtant, comme nous l'avons vu plus haut, des trois ficolines, les concentrations plasmatiques de la ficoline H sont les plus élevées, elle a la plus grande capacité d'activation du complément et une résistance aux collagènases (que n'ont pas les autres) [38]. On pourrait donc penser que si la ficoline H a un rôle infectieux limité elle joue un autre rôle, par exemple dans l'élimination des cellules apoptotiques.

2.6. Rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques

Comme cela a été montré pour le C1q, la MBL et la ficoline L, la ficoline H se lie aux cellules apoptotiques [51] et facilite leur élimination [37]. Tout comme pour le C1q cette liaison se fait à une phase tardive de l'apoptose, surtout à la phase de nécrose cellulaire, après perte de l'intégrité de la membrane cellulaire. Les macrophages phagocytent précocement les cellules apoptotiques ; les cellules à une phase tardive de l'apoptose ou nécrotiques sont prises en charge par le complément car elles ont échappé aux premiers mécanismes d'élimination.

La liaison de la ficoline H aux cellules apoptotiques a été mise en évidence aux concentrations sériques physiologiques de ficoline H chez l'homme. Elle est calcium dépendante (l'EDTA étant inhibiteur), dose dépendante et saturable.

Si la MBL et la ficoline L semblent se lier à l'ADN et l'ARN des cellules apoptotiques [74] la ficoline H quant à elle a d'autres cibles. De même elle ne se lie pas aux mêmes lignées de cellules apoptotiques que la ficoline L [37] [51]. Cette différence de ligands explique peut–être en partie le fait que la ficoline H a un rôle d'opsonisation des cellules apoptotiques beaucoup plus puissant que la ficoline L : en effet celle-ci n'augmente que légèrement la prise en charge des cellules nécrotiques alors que la ficoline H favorise l'élimination des cellules apoptotiques à un stade tardif en plus des cellules nécrotiques [37].

Selon différentes études [19] [71] le C1q et la MBL semblent agir comme des opsonines pour les cellules apoptotiques en se liant à la surface des macrophages par l'intermédiaire du recepteurcalréticuline-CD91. Or la ficoline H se lie à la calréticuline [37] il est donc possible qu'elle se lie aussi au recepteur calréticuline-CD91 des macrophages. En effet, son interaction avec la calréticuline est inhibée par la MBL suggérant qu'ils ont le même site de fixation à la calréticuline. Cependant il existe d'autres récepteurs pour la ficoline H au niveau des macrophages, en effet le blocage de la calréticuline n'inhibe pas la phagocytose médiée par la ficoline H.

OBJECTIFS

Dans la première partie de cette introduction concernant les marqueurs biologiques du lupus il est mis en évidence un besoin de nouveaux marqueurs pour cette pathologie.Les atteintes peuvent être graves (insuffisance rénale terminale, neurolupus…) et sont difficilement prédictibles. Pour l'atteinte rénale, qui est la complication grave la plus fréquente, la protéinurie n'est pas assez sensible pour mettre en évidence une atteinte débutante. Les anticorps anti-ADN ne sont que très moyennement performants [48], et très variables selon la technique. Quant aux anticorps anti-C1q, s'ils semblent les plus pertinents [3] [65] [97] ils sont parfois controversés [46], et seraient plus spécifiques d'un certain type d'atteinte rénale [44]. Par ailleurs le lupus est la plus fréquente des connectivites après la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome de GougerotSjögren [66). Anticiper les poussées pour pouvoir les prendre en charge au plus vite réduirait la morbidité et les coûts en termes de santé publique. La recherche de nouveaux marqueurs est donc un enjeu important pour le suivi des patients lupiques.

Dans la deuxième partie nous montrons l'intérêt de la ficoline H comme protéine en lien avec le lupus et par là même l'intérêt qu'il y aurait à doser les anticorps anti-ficoline H. En effet cette protéine a été découverte par l'intermédiaire de son anticorps et chez des patients lupiques [41]. Par ailleurs sa structure et son fonctionnement sont proches du C1q, de la MBL et des autres ficolines. Or il a été montré l'intérêt de ces protéines en particulier des anticorps anti-C1q. De plus la ficoline H ne semble pas avoir un rôle anti-infectieux majeur et elle a pourtant parmi les ficolines la plus forte concentration [38]. Et enfin elle a un rôle puissant d'opsonisation des cellules apoptotiques, phénomène important dans la physiopathologie du lupus [37].

L'objectif principal de cette étude est donc d'évaluer l'intérêt des anticorps anti-ficoline H parmi les autres marqueurs biologiques sur une population de patients lupiques. L'objectif secondaire est d'évaluer 2 trousses de dosage d'anticorps anti-ADN pour le suivi des patients lupiques.

Pour répondre à ces objectifs nous étudierons d'abord la présence d'anticorps anti-ficoline H dans la population générale et chez les patients lupiques puis le lien entre anticorps anti-ficoline H et activité lupique. Ensuite nous évaluerons les deux coffrets de recherche d'anticorps anti-ADN. Après nous comparerons les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-ADN, puis les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-C1q. Enfin nous évaluerons les anticorps anti-ficoline H, parfois associés aux anticorps anti-ADN et anti-C1q en fonction du type de poussée lupique.

MATERIELS ET METHODES

1.Type d'étude

Pour l'évaluation d'un marqueur il existe plusieurs types d'études possibles :

- Etude transversale : l'association entre la clinique du patient et le marqueur est mesurée à un instant t ;
- Etude de cas témoin : étude rétrospective, longitudinale (les données sont recueillies sur une période de temps pour un patient par opposition à l'étude transversale qui est une vision à un instant t) ;
- Etude de cohorte : prospective, longitudinale. L'étude de cohorte est plus puissante statistiquement qu'une étude transversale ou une étude cas témoin. Mais elle est plus lourde à mettre en place. Elle se fait donc souvent dans un deuxième temps, une fois que le marqueur biologique a montré son intérêt.

Ici ont été réalisées d'une part une étude transversale sur un groupe de patients et de témoins sains et d'autre part une étude cas témoin par le suivi de quelques patients pertinents.

2. Tests statistiques

Nous avons utilisé différents tests statistiques non paramétriques (car absence de normalité de la distribution des échantillons) :

- Le test de corrélation non paramétrique de Mann Whitney pour évaluer le lien entre deux facteurs pour des valeurs non appariées (sujets sains et population lupique, activité et rémission).
- Le test de corrélation non paramétrique de Spearman pour évaluer le lien entre deux facteurs pour des valeurs appariées (différents marqueurs biologiques chez les patients lupiques).
- Le test non paramétrique du Chi2 qui a l'avantage de ne pas tenir compte de la répartition des valeurs (notamment les valeurs élevées qui ont beaucoup de poids dans les autres tests).

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel « Statview™ ». Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

3. Population

3.1. Critères diagnostiques et de suivi de l'activité lupique

Pour ces patients le diagnostic de lupus avait été établi selon les critères de l'ACR (1.1.2.) et les patients dont le diagnostic était douteux ont été exclus de l'étude.

L'activité du lupus a été définie par le SLEDAI (annexe1) [10] ; un lupus est considéré comme actif pour un SLEDAI ≥ 5 et en rémission pour un SLEDAI<5.

Pour l'étude des anticorps anti-ADN, l'activité du lupus a aussi été déterminée par un SLEDAI modifié (SLEDAIm), dans lequel les anticorps anti-ADN ne font plus partie des critères. Un lupus sera alors considéré comme actif quand SLEDAIm ≥ 4 et en rémission quand SLEDAIm< 4 [59].

L'atteinte rénale du lupus a été définie à partir des courriers des cliniciens qui s'appuyaient sur des critères variables (apparition ou augmentation d'une protéinurie, biopsie rénale…)que nous ne détaillerons pas ici.

3.2. Nombre, sexe et âge des patients lupiques et caractéristiques des sujets sains

L'étude a été réalisée à partir de 109 sérums du laboratoire d'immunologie du CHU de Grenoble, en partie en collaboration avec le service de médecine interne notamment avec le professeur L. Bouillet et le docteur F. Sarrot-Reynauld. Par ailleurs 17 sérums ont été envoyés du CHU de Saint-Etienne par le docteur S.Paul et 10 sérums du CHU de Marseille par le docteur L. Chiche.

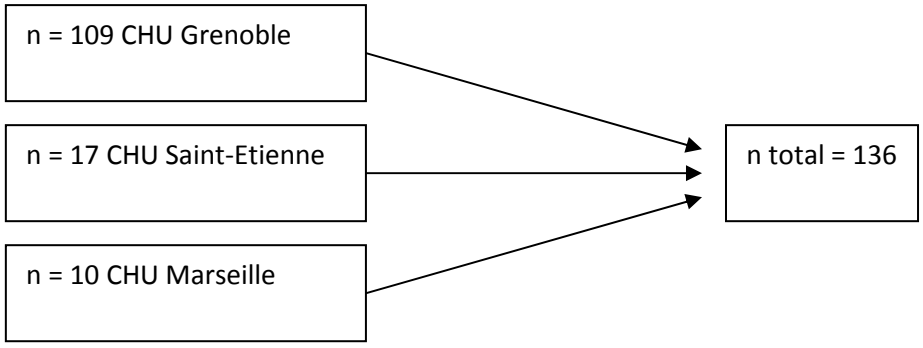


Figure 9 : Origines des sérums lupiques (n = nombre de sérums = nombre de patients)

Le sexe ratio était de 12 hommes pour 124 femmes.

La moyenne d'âge des patients lupiques était de 42,8 ans avec un âge maximal de 81 ans et un âge minimal de 8 ans.

Par ailleurs, les anticorps anti-ficoline H ont été dosés pour un suivi dans le temps chez 6 patients lupiques inclus présentant une alternance poussées (articulaires, cutanées, cardiaques ou hématologiques) et rémissions.

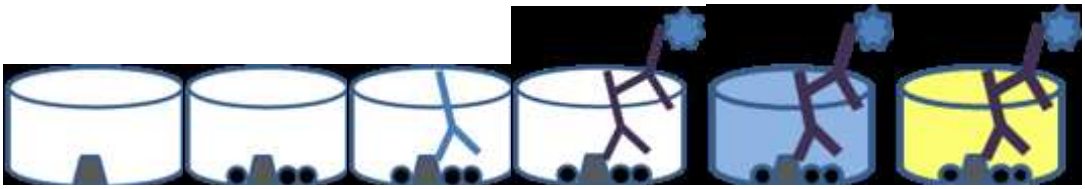
D'autre part, parmi les patients lupiques inclus dans l'étude, 5 autres ont été retenus pour étudier la variation des anticorps anti-ficoline H, anti-C1q et anti-ADN dans le temps. Ces patients présentaient tous une poussée rénale (et pas d'autres types de poussées par ailleurs) lors de la période étudiée.

Il a été testé 59 sérums de sujets sains. Ces sérums provenaient de l'EFS (Etablissement français du sang), leur sexe, âge ou origine ethnique ne sont pas connus.

4. Techniques

4.1. Dosage des anticorps anti-ficoline H par ELISA

La technique ELISA a été mise au point précédemment au laboratoire d'immunologie de Grenoble.



Adsorption Saturation Fixation Révélation Coloration

Figure 10 : Représentation schématique du principe de l'ELISA pour le dosage d'un anticorps

- Adsorption

La ficoline H recombinante (produite et mise à disposition par le Dr N. Thielens, Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale à Grenoble) est adsorbée sur une plaque Nunc (immunoplate MAXISORP© 96 puits). Les préparations initiales sont à 650 µg/ml et à 730µg/ml.

Pour chaque sérum on a :

- 2 puits adsorbés par 100 µl de ficoline H diluée en tampon carbonate bicarbonate (Na2CO3 (PM 106) 0,159 g/100ml, naHCO3 (PM 84) 0,293 g/100ml, pH = 9.6) pour obtenir une concentration en ficoline H de 2 µg/ml
- un puit adsorbé par 100 µl de tampon carbonate bicarbonate seul

Les plaques sont recouvertes de parafilm et laissées une nuit à + 4° C.

- Saturation

Le lendemain à 14h, les plaques sont lavées 3 fois par du PBS (« Phosphate buffered saline ») tween 0,1% (poids (g) de tween /volume (ml) de PBS). Puis, les puits sont saturés par 250 µl de PBS tween additionné de 1% (poids (g) /volume (ml)) de sérumalbumine bovine (BSA) pendant 2 heures à température ambiante.

- Fixation

Après 3 lavages en PBS Tween 0,1%, 100µl de chaque échantillon dilué au 1/50ème dans du PBS Tween BSA 0,1% sont déposés par puit. Pour chaque plaque un contrôle positif (toujours le même sérum dont des aliquots sont conservés à -80°C) et un contrôle négatif sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées pendant une nuit à 4°C.

- Révélation

Les plaques sont lavées 4 fois en PBS Tween 0.1%. Elles sont ensuite révélées par 100 µl d'anticorps anti-IgG humaine couplé à la peroxydase (Paris) dilué au 1/15000ème en PBS tween BSA 0.1% pendant une heure à température ambiante.

- Coloration

Enfin après 4 lavages en PBS Tween 0,1%, 100 µl de TMB (Tetramethyl benzidine) sont déposés dans chaque puit. Au bout d'environ 10 minutes la réaction est stoppée par ajout de 50 µl H_2 SO_4 1N. Les densités optiques (DO) sont lues à 450nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio Teck®).

- Calcul des résultats

L'obtention des résultats se fait en calculant dans un premier temps la moyenne des DO (Δ D.O.) pour chaque sérum.

Δ D.O.: Moyenne puits adsorbés par la ficoline H – puit non adsorbé par la ficoline H

Puis le résultat s'obtient en calculant un indice par rapport au contrôle positif qui est notre référence pour chaque manipulation.

Calcul de l'indice : (Δ D.O. malade) X 100 / Δ D.O. Contrôle positif

Le résultat est en unités arbitraires (UA). Le contrôle est ajouté dans toutes les manipulations et permet d'homogénéiser le rendu des résultats. Ce n'est pas un « cut-off » (sérum constitué d'un « pool » correspondant au seuil de positivité et inclus dans chaque manipulation), il est au-dessus du seuil de positivité. Les résultats sont donc rendus en pourcentage de cette valeur.

- Détermination du seuil de positivité

Statistiquement, la distribution des taux d'anticorps dans la population « normale » donneuse de sang n'est pas distribuée selon la loi normale gaussienne. Il convient donc de choisir la méthode des centiles pour le calcul statistique de la valeur-seuil.

Cela revient à déterminer le 98ème percentile du groupe des témoins sains, la valeur obtenue correspondant à notre seuil de positivité.

4.2. Dosage des anticorps anti-C1q par ELISA

On recherche les anticorps dirigés contre la partie collagène du C1q (ce sont ceux qui sont dosés en routine dans les laboratoires) [45].

C'est une technique ELISA.

- Adsorption

La protéine C1q CLF (« collagenlike fraction ») (à 1,15 mg/ml) est adsorbée sur une plaque Nunc (immunoplate MAXISORP© 96 puits).

Pour chaque sérum on a :

- 2 puits adsorbés par 100 µl de C1q CLF dilué en tampon BBS (« Borate buffered saline » : $H_3BO_3$0,2 M ; NaCl 0,075 M ; pH = 8.2) pour obtenir une concentration en C1q de 10 µg/ml, soit 1000 ng/puit.
- un puit adsorbé par 100 µl de tampon BBS seul

Les plaques sont recouvertes de parafilm et laissées une nuit à + 4° C.

- Saturation

Le lendemain matin, les plaques sont lavées 3 fois par du PBS tween 0,1% (poids (g) de tween /volume (ml) de PBS). Puis les puits sont saturés par 250 µl de PBS tween additionné de 2% (poids (g) /volume (ml)) de BSA pendant 30 minutes à 37°C.

- Fixation

Après 3 lavages en PBS Tween 0,1%, 100µl de chaque échantillon dilué au 1/200ème dans du PBS Tween BSA 0,1% sont déposés par puit. Pour chaque plaque un « cut-off », un témoin positif et un témoin négatif sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées pendant 1/2 heure à 37°C.

- Révélation

Les plaques sont lavées 4 fois en PBS Tween 0.1%. Elles sont ensuite révélées par 100 µl d'anticorps anti-IgG humaine couplé à la peroxydase (Paris) dilué au 1/60000ème en PBS tween BSA 0.1% pendant 1/2 heure à 37°C.

- Coloration

Enfin après 4 lavages en PBS Tween 0,1%, 100 µl de TMB sont déposés dans chaque puit. Au bout d'environ 15minutes la réaction est stoppée par ajout de
50 µl H_2 SO_4 1N. Les densités optiques (DO) sont lues à 450nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Bio Teck®)

- Calcul des résultats

L'obtention des résultats se fait en calculant dans un premier temps la moyenne des DO (Δ D.O.) pour chaque sérum.

Δ D.O.: Moyenne puits adsorbés par le C1q – puit non adsorbé par le C1q

Puis, le résultat s'obtient en calculant un indice par rapport au « cut-off ».

Calcul de l'indice : (Δ D.O. malade) X 100 / Δ D.O. « cut-off »

Le résultat est en unités arbitraires (UA).

4.3. Dosage des anticorps anti-ADN par ELISA

Pour les patients de Grenoble les anticorps ont été dosés selon la trousse de dosage utilisée alors : QuantaLite™ (INOVA) puis redosés avec un nouveau coffret Kallestad™ (Bio-rad).

Ces deux trousses de dosage sont basées sur le principe de l'ELISA et sont utilisées sur l'automate Evolis de Bio-rad.

Fournisseurs	INOVA	Bio-rad
Réactifs	QuantaLitedsDNA SC ELISA	Kallestad™ anti-dsDNAmicroplate EIA
Référence	704650	31008
Nature de l'antigène	ADNdb de thymus de veau	ADNdb de thymus de veau
Standardisation Wo80	Oui	Oui
Nature de l'anticorps Conditionnement	Anticorps de chèvre anti-IgG humaines 88 sérums/ 96 tests	Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG et IgM humaines 82 sérums/96 tests
Calibrateurs	12,3/37/111/333/1000 UI/ml prêts à l'emploi	0/10/50/150/300 UI/ml prêts à l'emploi et à passer en double
Contrôle ADN sb	Oui	Non
Dilution échantillon	1/101ème avec diluant	1/100ème avec diluant
Reconstitution des réactifs	Tampon de lavage	Tampon de lavage, contrôles + et - , diluant
Temps d'incubation (min.)	30+30+30 à l'obscurité	60+30+30
DO	450nm	550nm
Seuil significatif UI/ml	Négatif<30 30<équivoque<75 Positif>75	Négatif<30 30<équivoque<50 50<positif<300 Fortement positif >300

Tableau 8 : Caractéristiques des 2 coffrets d'anticorps anti-ADN testés

Les résultats obtenus sont validés si les courbes de calibration et les contrôles internes sont situés dans les gammes spécifiées par le fabricant.

RESULTATS

1. Les anticorps anti-ficoline H chez les sujets sainset chez les patients lupiques

Les anticorps anti-ficoline H ont été dosés chez des sujets sains (population contrôle issue de l'EFS) et chez les patients lupiques inclus dans l'étude, indifféremment en poussée ou en rémission. Les anticorps anti-ficoline H sont exprimés en UA (unités arbitraires) après que leur DO ait été divisée par la DO du contrôle interne positif inclus dans chaque plaque de manipulation puis multipliée par 100. Le nombre de sérums contrôles est de 59 ; les valeurs extrêmes en anticorps anti-ficoline H sont : min (minimum) = 0 UA et max (maximum) = 110 UA. Le maximum correspond à un sérum isolé élevé qui se démarque des autres. Le nombre de sérums de patients lupiques est de 136 ; les valeurs extrêmes en anticorps anti-ficoline H sont : min = 0 UA et max = 319,6 UA.

Ces anticorps sont retrouvés de façon significative p = 0,0001 (test de Mann Whitney) dans la population lupique par rapport à la population contrôle (figure 11).

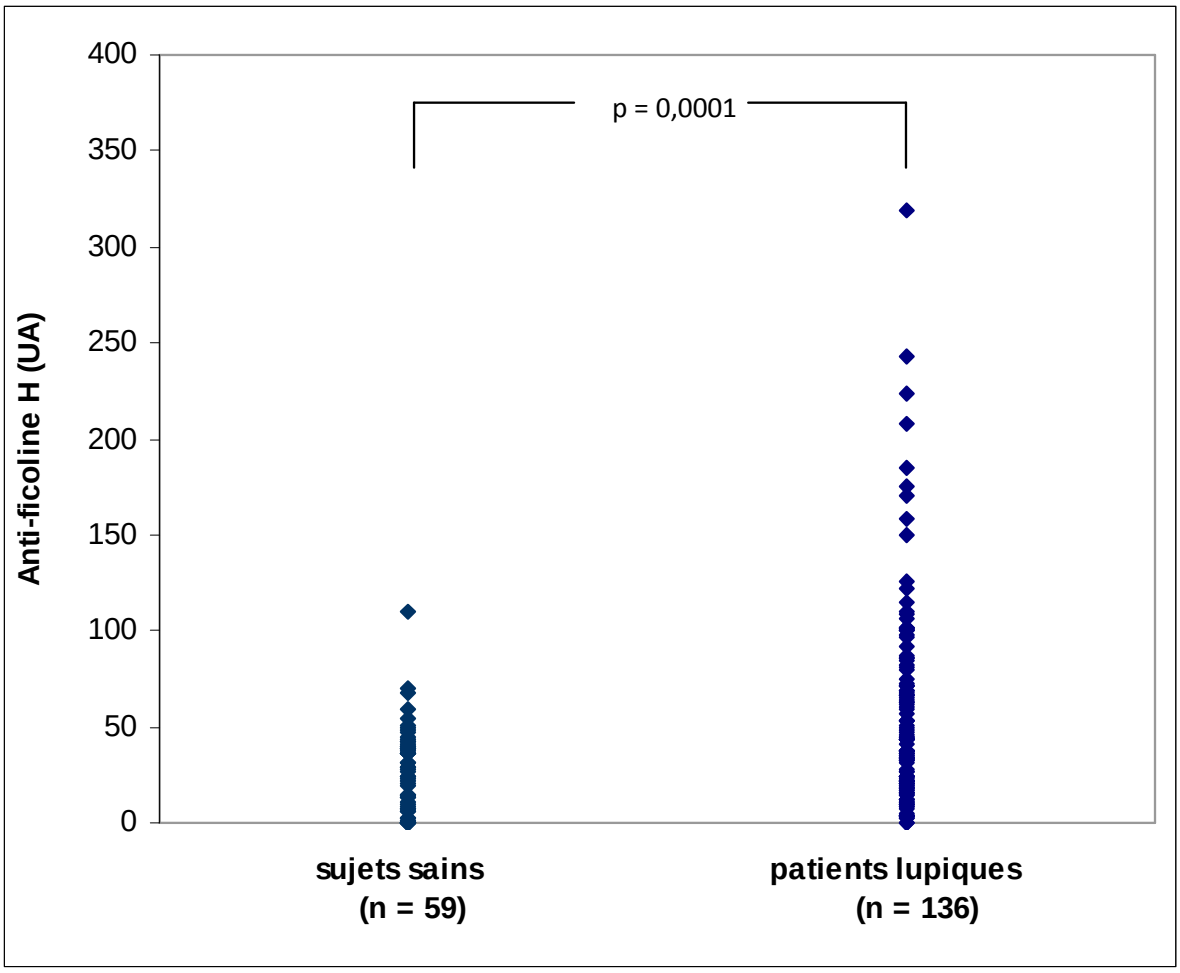


Figure 11 : Les anticorps anti-ficoline H chez des sujets sains et chez des patients lupiques, (« p » du test de Mann Whitney)

Dans la suite de ces résultats il est souvent utilisé le test du chi 2 en association avec le test de Spearman. Le test du chi 2, en particulier pour les corrélations qui impliquent les anticorps anti-ADN, est plus pertinent que le test de Spearman. En effet, contrairement au test de Spearman ce test ne prend pas en compte les valeurs extrêmes qui peuvent être très élevées dans le cas des anticorps anti-ADN. Ces valeurs extrêmes entraînent quasi systématiquement une corrélation par le test de Spearman.

2. Corrélation entre les anticorps anti-ficoline H et l'activité lupique

Le taux d'anticorps anti-ficoline H a ensuite été comparé au SLEDAI (score d'activité du lupus). Le seuil de positivité des anticorps anti-ficoline H a été défini à 70 UA en calculant le 98ème percentile de la population de sujet sains. Quant au seuil du SLEDAI (≥ 5), il n'est pas fixé de façon consensuelle. C'est un choix arbitraire après discussion entre biologistes et cliniciens. Certains auteurs considèrent par exemple que le patient est en poussée minime pour un SLEDAI entre 1 et 5 [86]. Le SLEDAI est calculé en tenant compte des signes cliniques et biologiques présentés par le patient (annexe 1) et le seuil déterminé correspond à la limite entre lupus actif (SLEDAI ≥ 5) et lupus inactif (SLEDAI < 5).
20 patients sur 136 ont des anticorps anti-ficoline H positifs et un lupus actif (SLEDAI ≥ 5).Les anticorps anti-ficoline H sont corrélés au SLEDAI par le test du chi 2 (chi2 = 5,55, p = 0,0184) et par le test de Spearman (p = 0,0052) (figure 12).

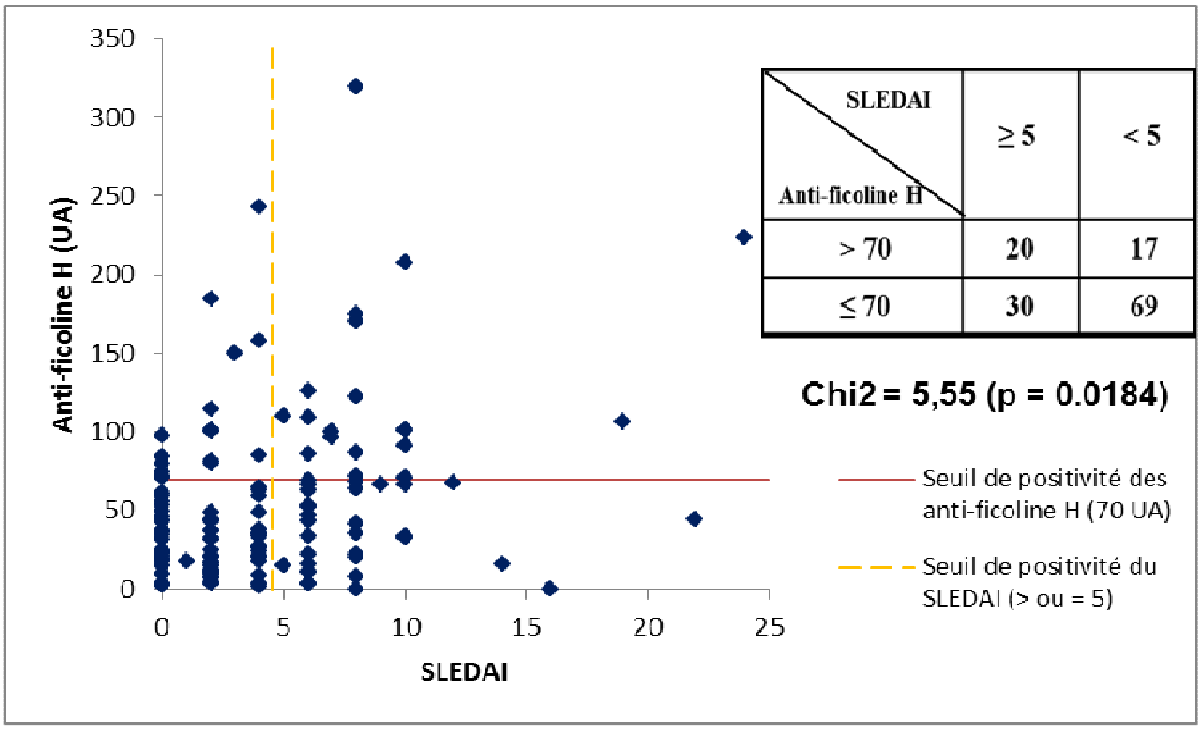


Figure 12 : Corrélation entre les anticorps anti-ficoline H et le SLEDAI, test statistique de Spearman : p = 0,0052

Dans un second temps les anticorps anti-ficoline H sont comparés à l'activité du lupus au sein des patients répartis en 2 groupes : «poussée» (SLEDAI ≥ 5) et «rémission» (SLEDAI < 5) (figure 13). 50 patients étaient en poussée et 86 patients étaient en rémission.

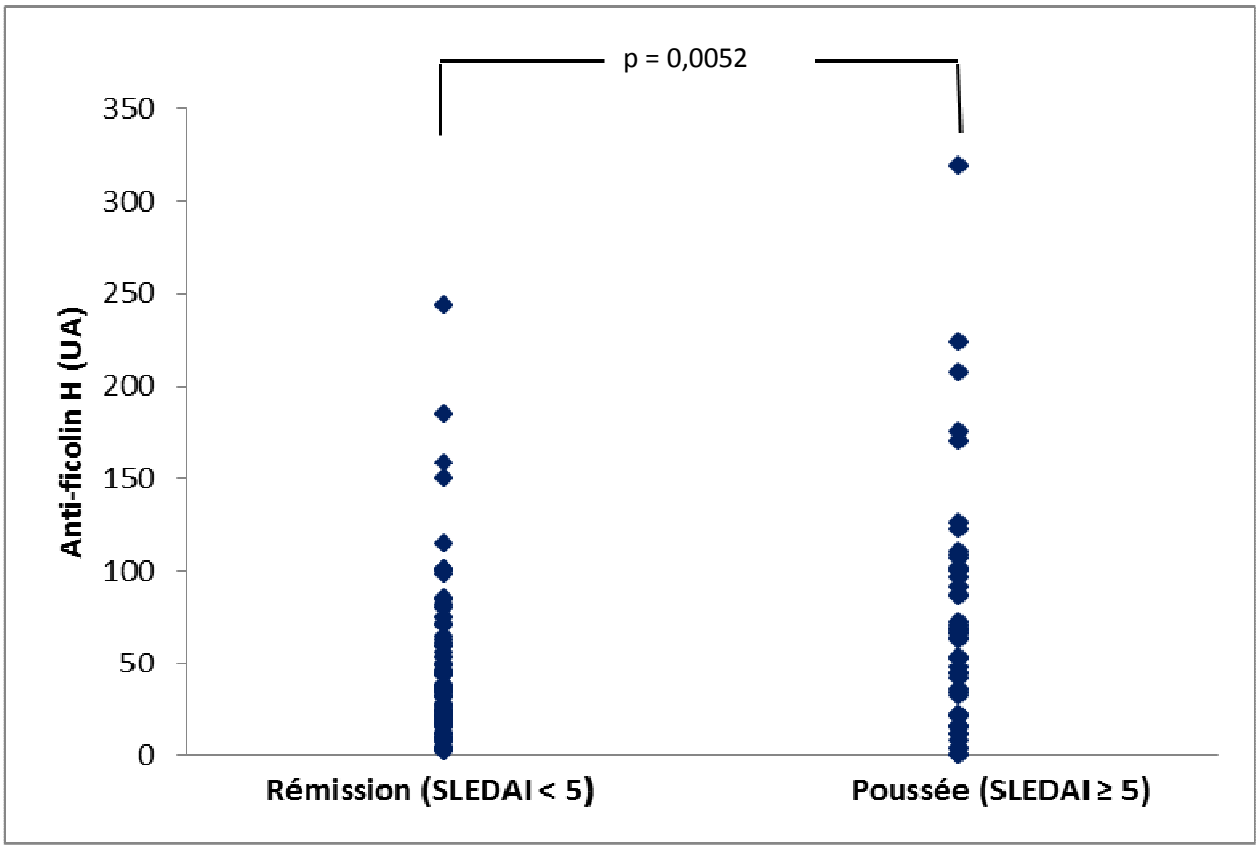


Figure 13 : Corrélation entre les anticorps anti-ficoline H et l'activité lupique, (« p » du test de Mann Whitney)

Statistiquement les anticorps anti-ficoline H sont corrélés à l'activité du lupus (p = 0,0052, test de Mann Whitney).

Les valeurs des « p » des tests non paramétriques de Spearman (utilisé pour la corrélation des anticorps ant-ficoline H au SLEDAI) et de Mann Whitney (utilisé pour la corrélation des anticorps à l'activité de façon globale) sont d'ailleurs identiques.

3. Les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-ADN double brin

3.1. Anticorps anti-ADN : corrélation entre 2 coffrets et corrélation avec le SLEDAI

Les anticorps anti-ADN db (double brin) sont à l'heure actuelle le marqueur le plus utilisé en routine pour le diagnostic et le suivi du lupus. Les tests de dosage de ces anticorps donnent des résultats très variables. Deux coffrets de dosage d'anticorps anti-ADN (Bio-rad™ et Inova™) ont donc été comparés chez les patients lupiques grenoblois (n = 105, les sérums de 3 patients étaient en quantité insuffisante) puis corrélés chacun avec le SLEDAI et le SLEDAI modifié. Nous avons ensuite évalué la corrélation des anticorps anti-ADN db dosés par le coffret Bio-rad™ avec les anticorps anti-ficoline H ; cette évaluation incluait les 136 patients de l'étude.

3.1.1. Comparaison des anticorps anti-ADN Bio-rad™ et Inova™

Nous constatons qu'il existe une corrélation entre les deux coffrets (test de Spearman : $p < 0,0001$, test du chi 2 : $p < 0,0001$ et chi2 = 40) (figure 14).

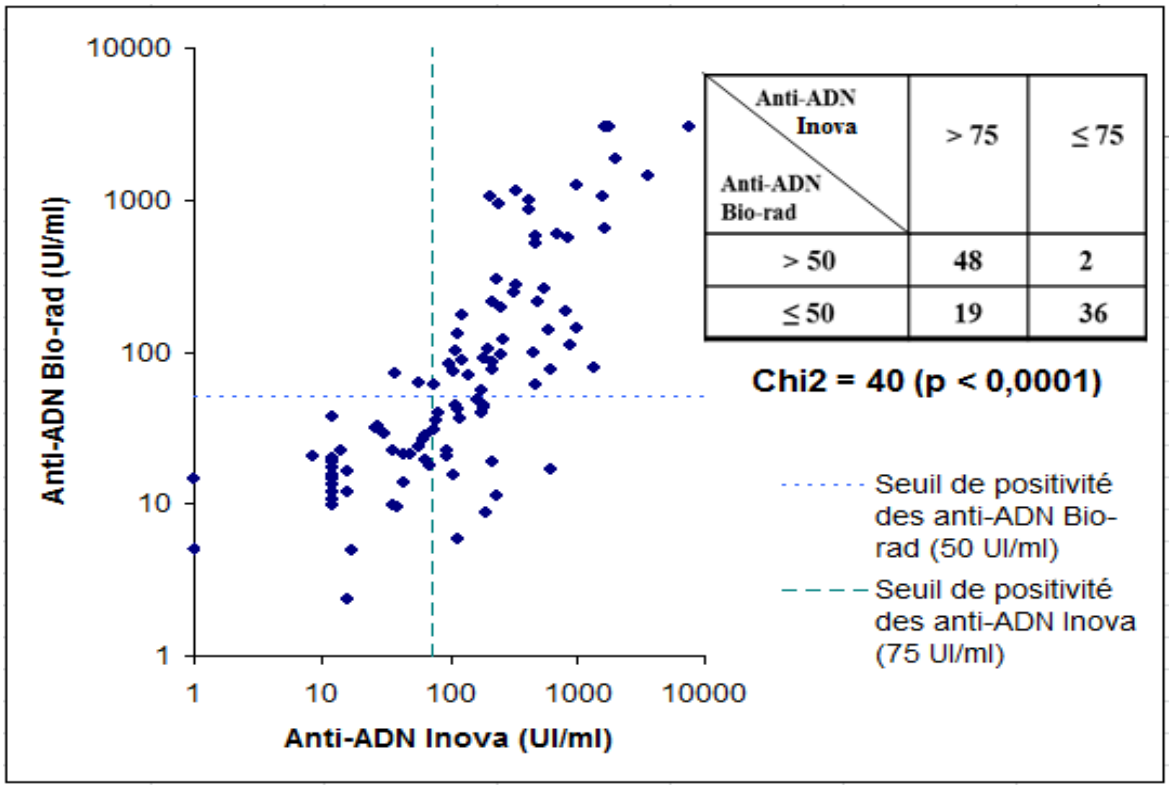


Figure 14 : Corrélation entre les anticorps anti-ADN Bio-rad™ et Inova™, test statistique de Spearman : p < 0,0001

Pour le coffret Bio-rad™ 50 patients sont positifs et 55 patients sont négatifs. Pour le coffret Inova™ 67 patients sont positifs et 38 patients sont négatifs.

Par ailleurs nous appellerons faux positifs (FP) les patients en rémission ayant des anticorps anti-ADN positifs et faux négatifs (FN) les patients en poussée ayant des anticorps anti-ADN négatifs. Nous observons :

- pour le coffret Bio-rad™ : FP = 33 ; FN = 16
- pour le coffret Inova™ : FP = 41 ; FN = 11

Le coffret Bio-rad™ a donc moins de faux positifs que le coffret Inova™ et un nombre de faux négatifs comparables.

3.1.2. Corrélation entre les anticorps anti-ADN Inova™ et le SLEDAI

Les anticorps anti-ADN Inova™ ont été dosés chez 107 patients grenoblois (1 patient n'a pu être dosé car son sérum était en quantité insuffisante). Leur seuil de positivité a été défini par le fabricant à 75 UI/ml. Etant donné l'étendue des valeurs retrouvées une échelle logarithmique a été utilisée. Le seuil de positivité du SLEDAI (≥ 5) est le même que celui utilisé pour les anticorps anti-ficoline H.

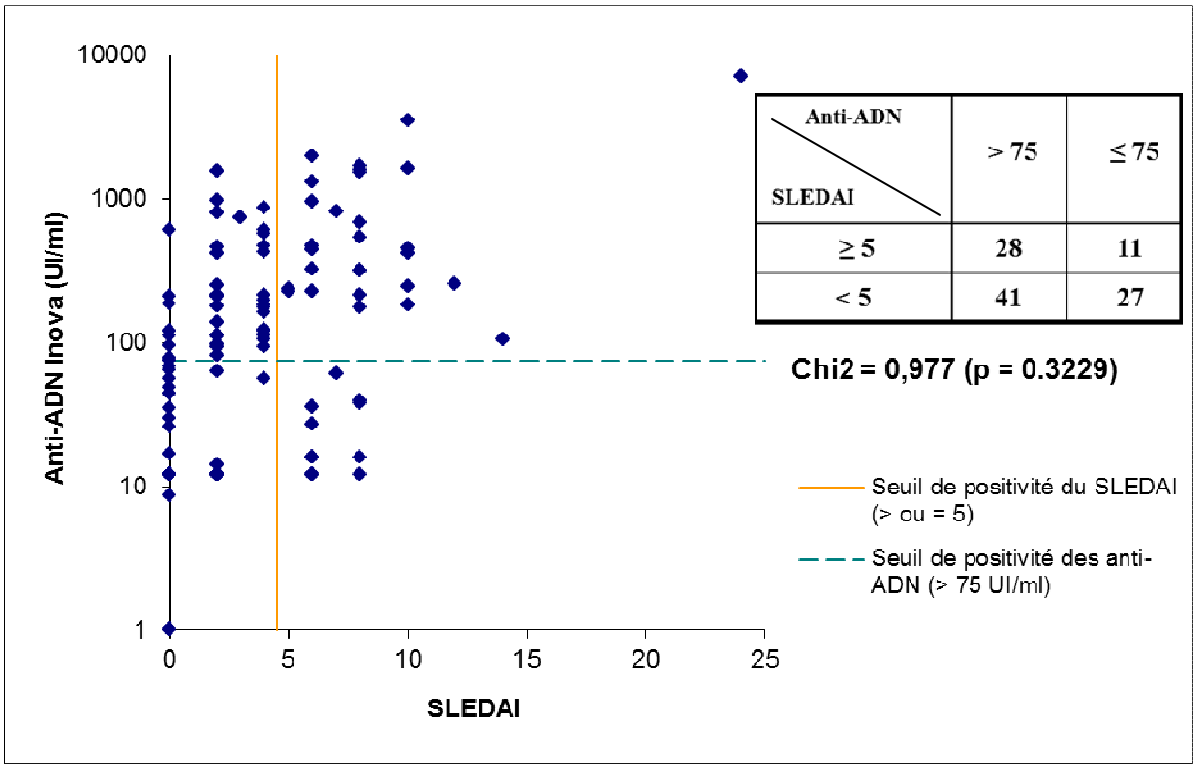


Figure 15 :Corrélation entre les anticorps anti-ADN (Inova™) et le SLEDAI, test statistique de Spearman : p < 0,0001

Au vue de la figure 15 les anticorps anti-ADN Inova™ ne sont pas corrélés au SLEDAI par le test du chi 2(chi 2= 0,977 p= 0,3229), mais bien corrélés par le test de Spearman (p < 0,0001).

3.1.3. Corrélation entre les anticorps anti-ADN Bio-rad™ et le SLEDAI

Les anticorps anti-ADN (Bio-rad™) ont été dosés chez quasiment tous les patients de l'étude (n = 134, 2 sérums de patients n'ont pu être dosés car ils étaient en quantité insuffisante). Leur seuil de positivité a été défini par le fabricant à 50 UI/ml. Etant donné l'étendue des valeurs retrouvées une échelle logarithmique a été utilisée.

68 patients sont positifs et 66 patients sont négatifs en ADN Bio-rad™.

Le seuil de positivité du SLEDAI est toujours ≥ 5.

Contrairement aux résultats observés avec la technique Inova™, nous constatons que les anticorps anti-ADN Bio-rad™ sont corrélés au SLEDAI par le test du chi 2(chi 2= 10,6 p=0,001) et par le test de Spearman (p < 0,0001) (figure 16).

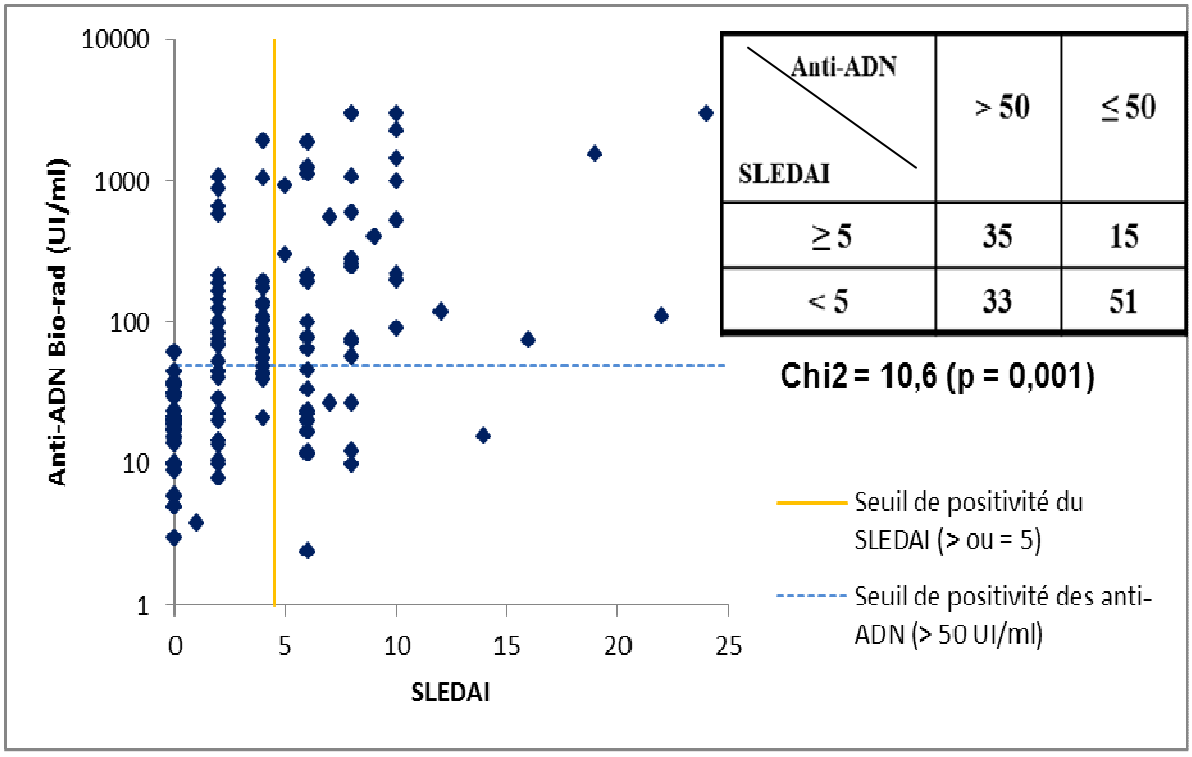


Figure 16 : Corrélation entre les anticorps anti-ADN (Bio-rad™) et le SLEDAI, test statistique de Spearman : p < 0,0001

3.1.4. Corrélation entre les anticorps anti-ADN Inova™ et le SLEDAIm

Comme nous l'avons vu dans la partie « matériels et méthodes », pour l'étude des anticorps anti-ADN, l'activité du lupus peut aussi être déterminée par un SLEDAI modifié (SLEDAIm), dans lequel les anticorps anti-ADN ne font plus partie des critères pour ne pas biaiser le résultat. Un lupus sera alors considéré comme actif quand SLEDAIm ≥ 4 et en rémission quand SLEDAIm< 4 [59].

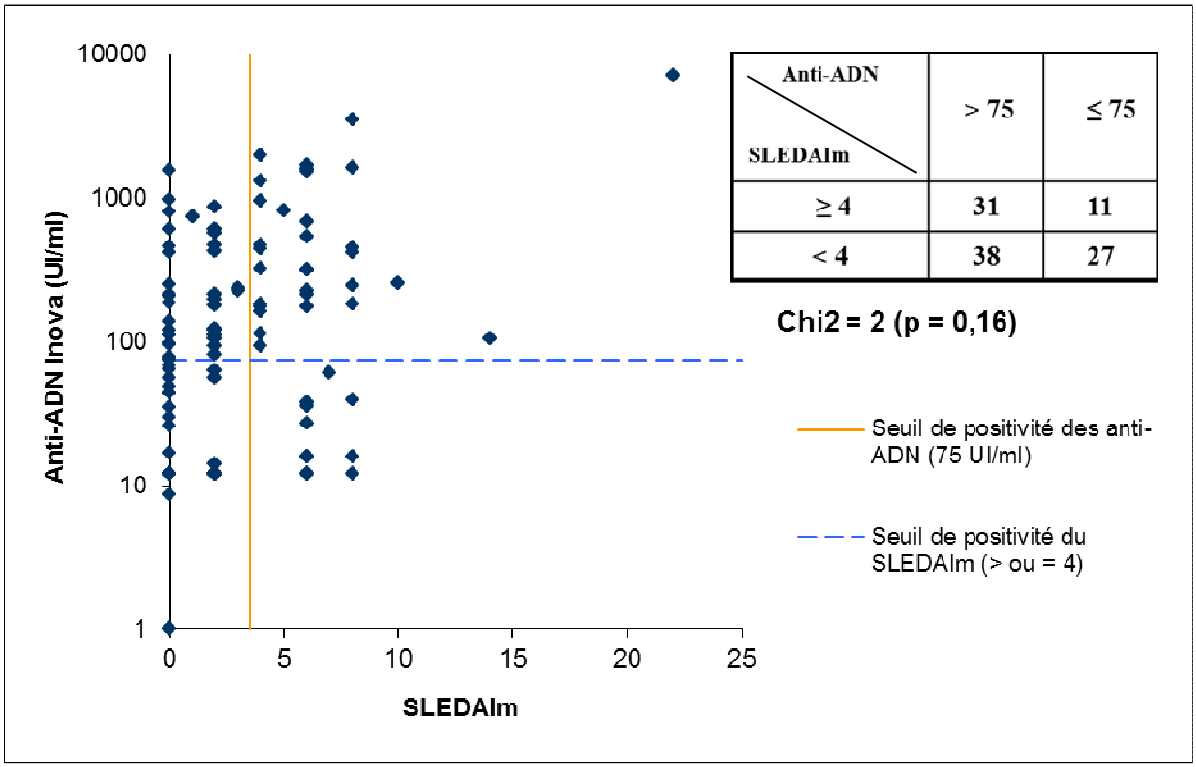


Figure 17 : Corrélation entre les anticorps anti-ADN (Inova™) et le SLEDAIm, test statistique de Spearman : p = 0,0033

Au vue de la figure 17 les anticorps anti-ADN Inova™ ne sont pas corrélés au SLEDAIm par le test du chi 2(chi 2= 2,002 p= 0,16), mais corrélés par le test de Spearman (p = 0,0033). Les résultats statistiques sont donc similaires que nous utilisions le SLEDAI ou le SLEDAI modifié.

3.1.5. Corrélation entre les anticorps anti-ADN Bio-rad™ et le SLEDAIm

Les anticorps anti-ADN (Bio-rad™) sont corrélés au SLEDAImpar le test du chi 2(chi 2=3,923, p=0,0476) et par le test de Spearman (p = 0,0002), mais de façon beaucoup moins significative qu'avec le SLEDAI (par le test du chi2 : p = 0,001 avec le SLEDAI et p = 0,0476 avec le SLEDAIm) (figure 18).

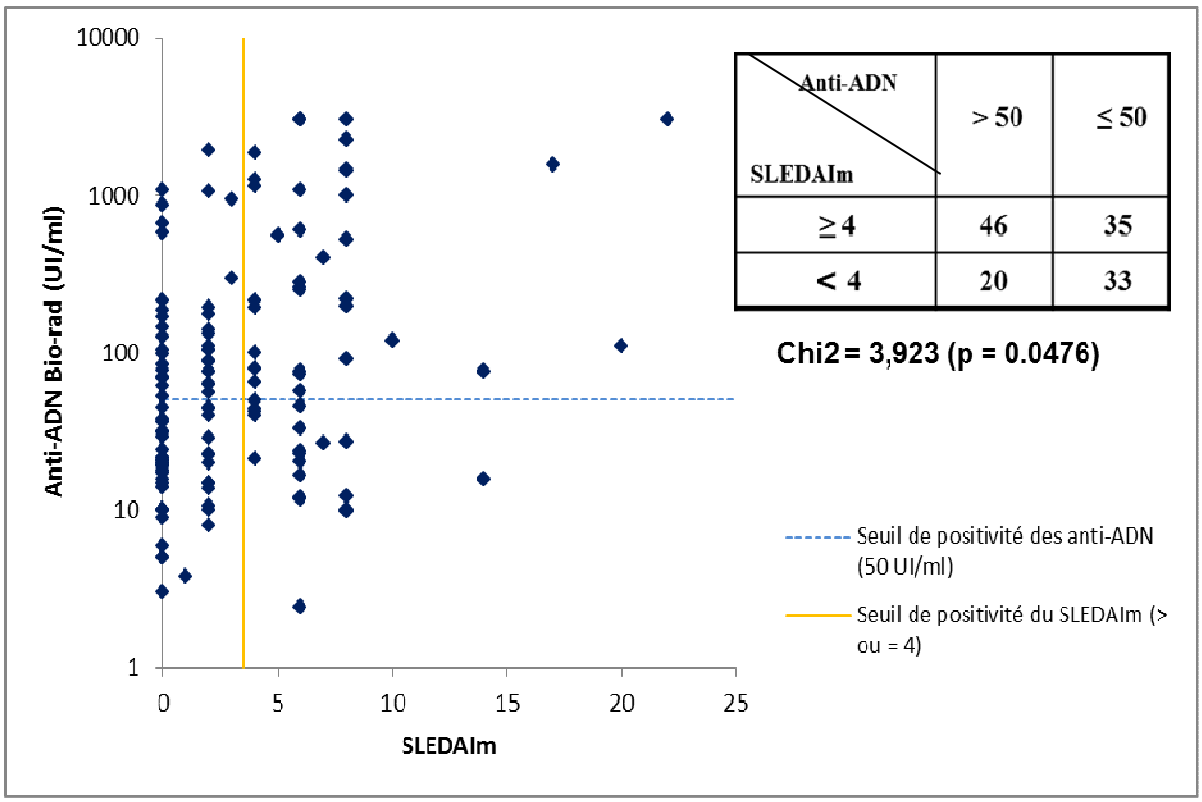


Figure 18 : Corrélation entre les anticorps anti-ADN (Bio-rad™) et le SLEDAIm, test statistique de Spearman : p = 0.0002

3.2. Corrélation entre anticorps anti-ficoline H et anticorps anti-ADN (Bio-rad™)

Nous nous sommes ensuite intéressés à la corrélation entre anticorps anti-ADN (Bio-rad™) et anticorps anti-ficoline H.Comme précédemment le seuil de positivité des anticorps anti-ficoline H est à 70 UA, celui des anticorps anti-ADN (Bio-rad™) à 50 UI/ml et les anticorps anti-ADN (Bio-rad™) sont représentés sur une échelle logarithmique.

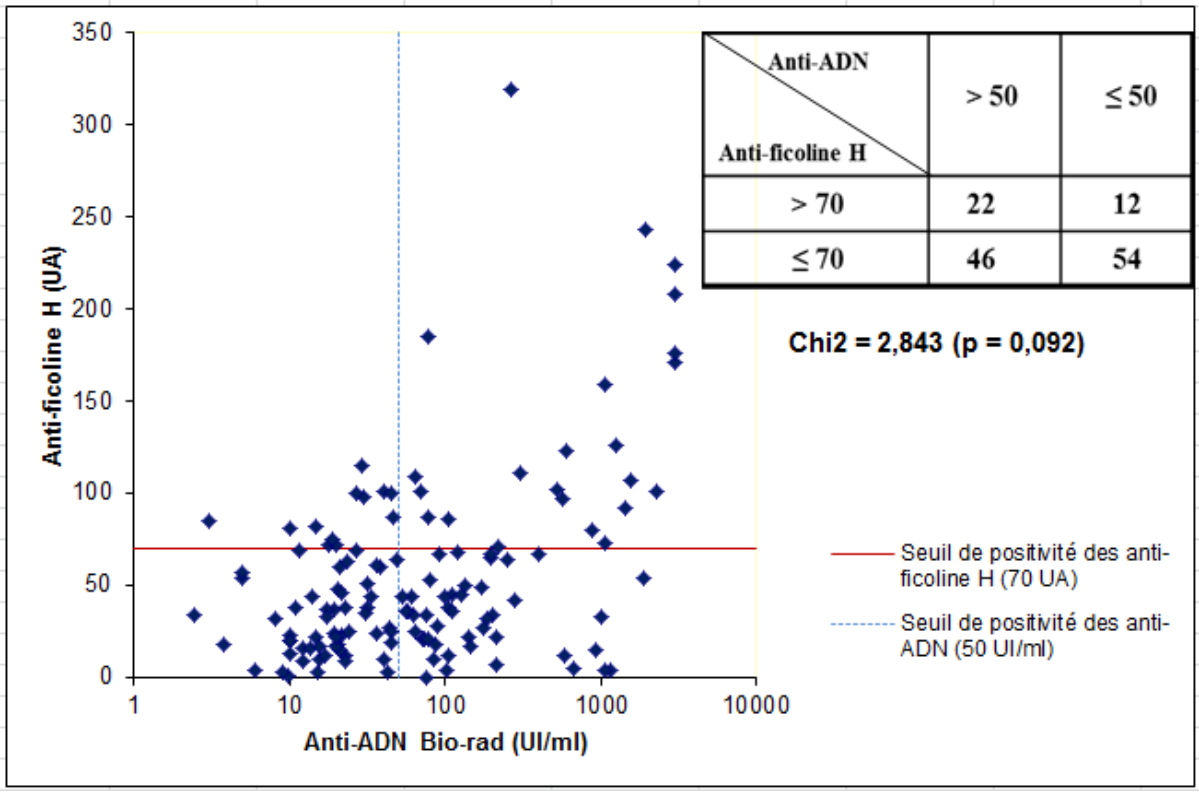


Figure 19 : Corrélation entre les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-ADN (Bio-rad™), test statistique de Spearman : p = 0.0026

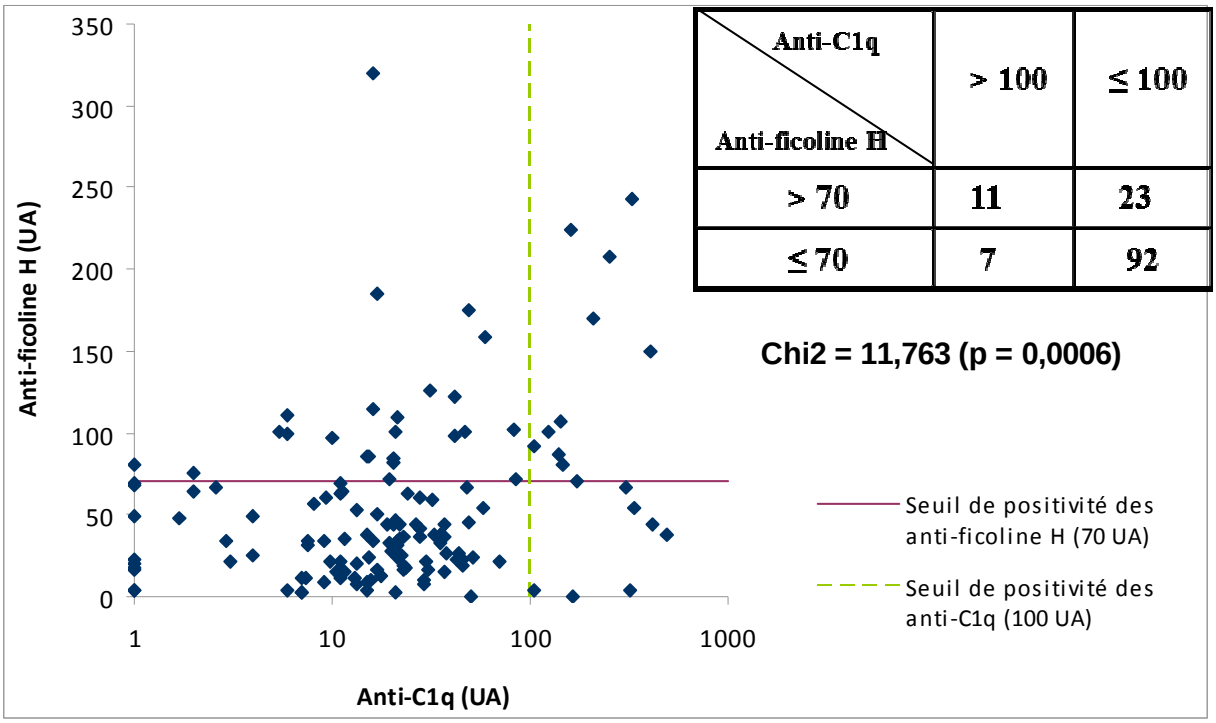
Par le test du chi2 il n'existe pas de corrélation entre les anticorps anti-ADN et les anticorps anti-ficoline H (p = 0,092, chi2=2,843) (figure 19). Nous observons par contre une corrélation par le test de Spearman entre les deux types d'anticorps (p = 0,0026).

4. Les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-C1q

Les anticorps anti-C1q sont un marqueur qui présente une bonne valeur prédictive négative pour la néphrite lupique active et qui a fait l'objet de nombreuses publications [46] [65] [79]. Il est donc intéressant de les comparer aux anticorps anti-ficoline H. Comme déterminé antérieurement le seuil de positivité des anticorps anti-ficoline H est de 70 UA ; celui des anticorps anti-C1q est de 100 UA (seuil utilisé en routine dans le laboratoire).

Pour le dosage des anticorps anti-C1q un « cut-off », constitué d'un « pool » de sérums ayant la DO du seuil de positivité, a été constitué et sert de référence. Pour celui des anticorps anti-ficoline H, c'est le contrôle positif qui sert de référence entre les manipulations.

Les anticorps anti-C1q sont exprimés en UA, leur valeur étant obtenue en divisant la DO du patient par la DO du « cut-off ». Ces anticorps ayant des valeurs très dispersées, une échelle logarithmique a été utilisée pour plus de lisibilité.



Anti-ficoline H \ Anti-C1q	> 100	≤ 100
> 70	11	23
≤ 70	7	92

Chi2 = 11,763 (p = 0,0006)

Figure 20 : Corrélation entre les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-C1q, test statistique de Spearman : p = 0.0093

Par le test du chi2 (chi2 = 11,763, p = 0,0006) et par le test de Spearman (p = 0,0093) nous observons une corrélation très significative entre les anticorps anti-ficoline H et les anticorps anti-C1q (figure 20).

5. Différents profils de patients lupiques en pousséeet anticorps anti-ficoline H

5.1. Les différents types de poussées rencontrées

Comme nous l'avons vu, les poussées de lupus peuvent atteindre différents organes, elles ont donc été divisées en différentes catégories :

- rénale (protéinurie > 0,5 g/24H, apparue ou en augmentation, parfois biopsie rénale)

- articulaire (arthrites, arthralgies multiples)

- pulmonaire (pleurésie)

- cardiaque (péricardite)

- cutanéomuqueuse (éruption cutané, nécrose des muqueuses)

- hématologie (thrombopénie <100 000/mm³, leucopénie <3 000/mm³)

- neurologie (céphalées, troubles neurologiques divers)

Ces catégories regroupent les manifestations cliniques décrites dans l'introduction. Les autres types d'atteintes n'étaient pas présentes dans notre groupe de patients lupiques.

5.2. Résultats de l'étude transversale

Dans un premier temps nous avons comparé le taux d'anticorps anti-ficoline H en fonction du type de poussée chez tous nos patients inclus avec un lupus en activité.

Les résultats sont présentés sous forme de tableau (tableau 9). Sachant que certains patients peuvent présenter une poussée atteignant plusieurs organes, la somme de tous les patients par manifestation clinique sera supérieure au nombre total de patients.

Le nombre total de patients en poussée est de 50. Pour 3 patients de Marseille les atteintes cardiaques, pulmonaires et neurologiques ne sont pas renseignées, pour ces atteintes le nombre de patients est donc 47 et non 50.

Sur les patients en poussée 14 sont positifs en anticorps anti-ficoline H et 36 sont négatifs.

Clinique	Nombre de patients	% /patients en poussée	Anti-ficoline H > 70	Anti-ficoline H ≤ 70	P (chi 2) sur poussées
Rénale	9	18%	6	3	0,0146
Articulaire	34	68%	12	22	0,18
Hématologique	8	16%	4	4	0,28
Cutanée	16	32%	3	13	0,5
Cardiaque	5	11%	2	3	0,9
Pulmonaire	3	6%	2	1	0,38
Neurologique	4	8%	2	2	0,66

Tableau 9 : Anticorps anti-ficoline H chez les patients de l'étude présentant différents types de poussées

Pour évaluer les anticorps anti-ficoline H en fonction du type de poussée le test du chi2 a été utilisé. Pour une évaluation de ce type plusieurs études ont déjà utilisé ce test statistique [88] [95].

Chez les 50 patients en poussée nous constatons qu'il existe une corrélation entre poussée rénale et présence d'anticorps anti-ficoline H ($p = 0,0146$, $chi2 = 6$). Tous les autres types de poussées ne sont pas corrélés aux anticorps anti-ficoline H ($p > 0,05$).

5.3. Résultats de l'étude longitudinale

5.3.1. Pour des patients présentant des poussées autres que rénales

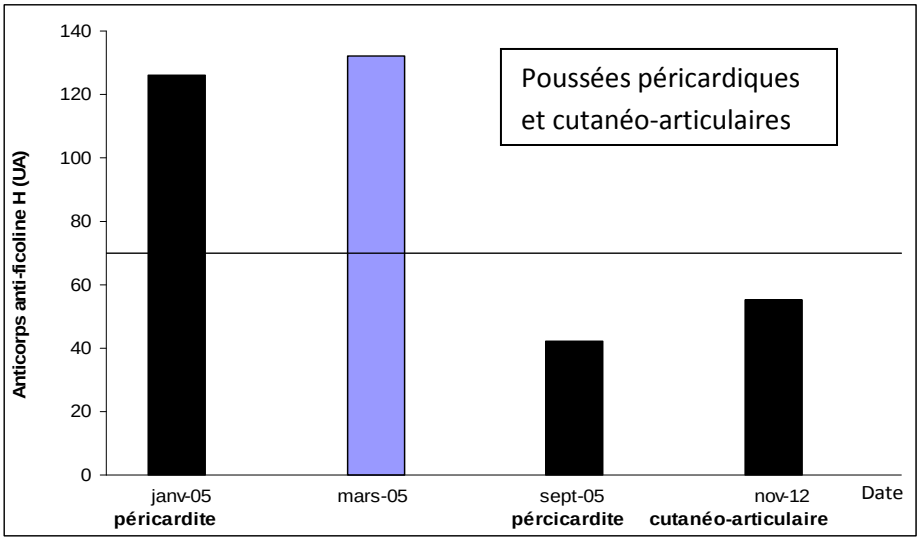
Dans un deuxième temps, nous avons observé la variation des anticorps anti-ficoline H dans le suivi de 6 patients lupiques présentant une alternance de rémissions et de poussées autres que rénales (péricardique, cutanée, articulaire, hématologique).

Rémission

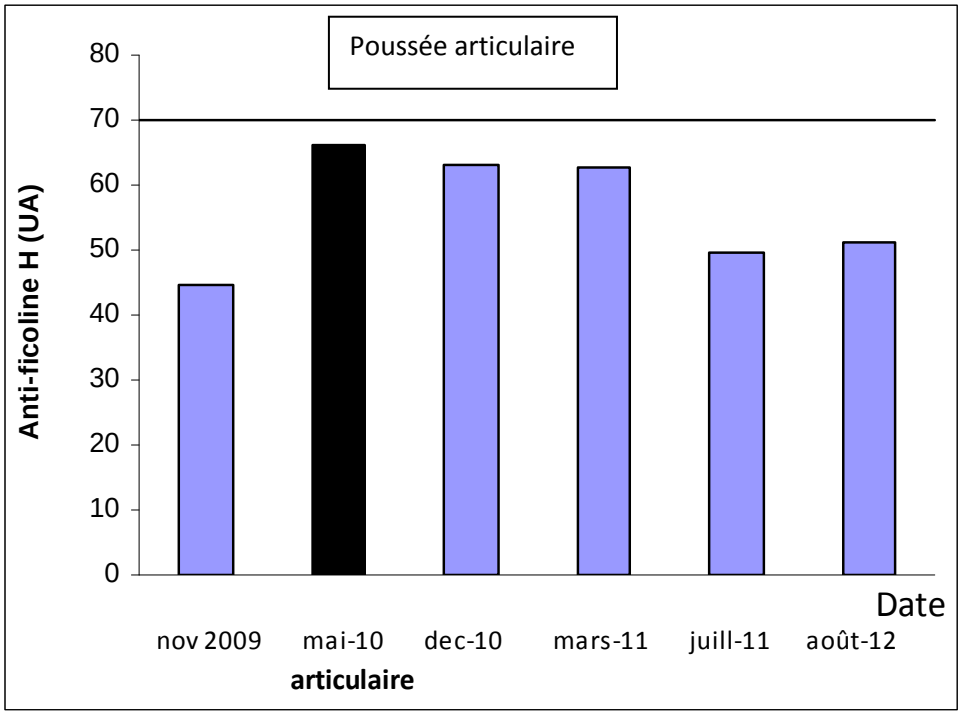
Poussée

seuil de positivité des anticorps anti-ficoline H (70 UA)

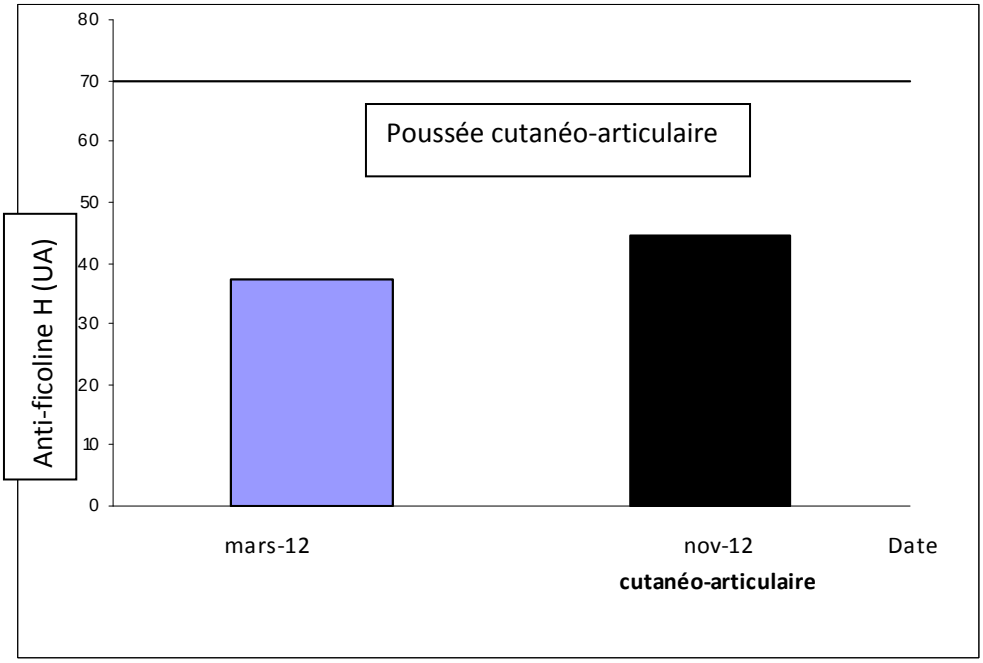
Patient 1



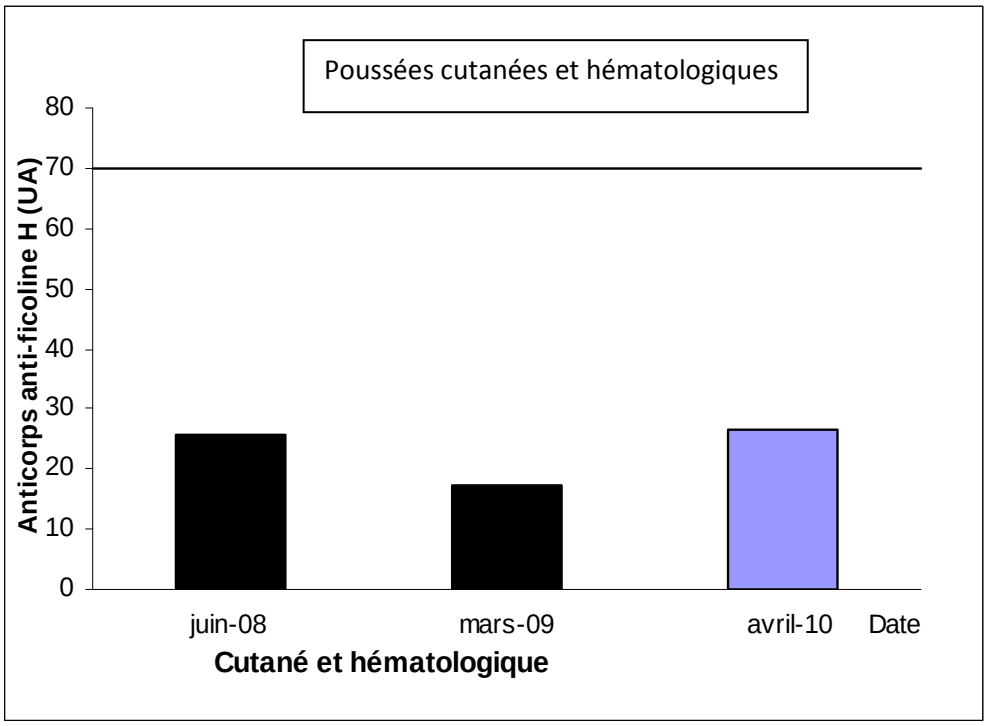
Patient 2



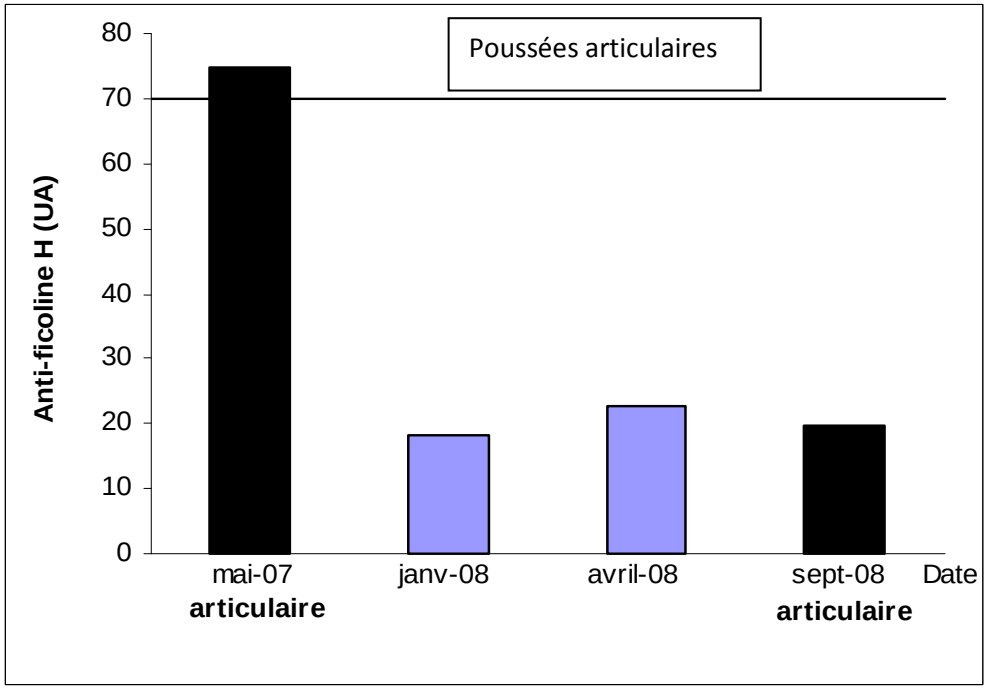
Patient 3



Patient 4



Patient 5



Patient 6

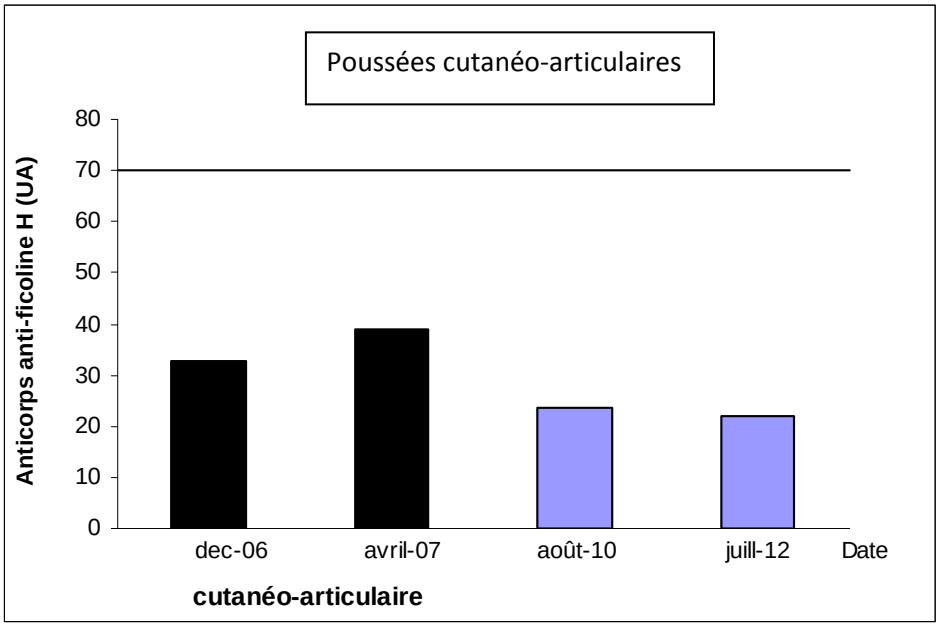


Figure 21 : Suivi des anticorps anti-ficoline H chez des patients présentant différents types de poussées lupiques

Nous constatons que dans le suivi des 6 patients présentant des poussées autres que rénales les anticorps anti-ficoline H ne suivent pas l'alternance poussée rémission.

5.3.1. Pour des patients présentant des poussées rénales

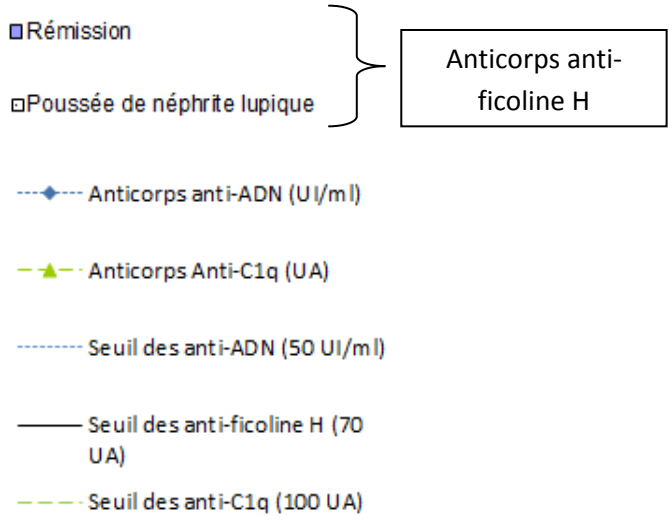
Puis, la variation des anticorps anti-ficoline H, anti-C1q et anti-ADN db a été observée chez 5 patients présentant une poussée rénale au cours de leur suivi (figure 22).

- Pour les anticorps anti-ADN : 3 patients chez les 5 (suivis 1, 3 et 4) présentent des anticorps positifs sur plusieurs prélèvements indépendamment de la poussée rénale (patients en rémission présentant des anticorps anti-ADN). Par contre, malgré le fait que l'on soit au-dessus du seuil de positivité la valeur de ces anticorps anti-ADN augmente en cas de poussée rénale. Pour les 2 autres patients (2 et 5) il existe une bonne corrélation entre l'apparition d'anticorps anti-ADN et la survenue d'une poussée de néphrite lupique.

- Pour les anticorps anti-C1q : 1 patient sur les 5 (suivi 4) présente des anticorps qui restent toujours négatifs sans jamais se positiver ; pour un patient (suivi 3) ceux-ci restent par contre toujours positifs sans se négativer lors des rémissions. Pour les 3

patients restants (suivis 1, 2 et 5) il existe une bonne corrélation entre l'apparition d'anticorps anti-C1q et la survenue d'une poussée rénale.

- Pour les anticorps anti-ficoline H : nous observons une très bonne corrélation entre la positivité des anticorps et la présence d'une poussée de néphrite.



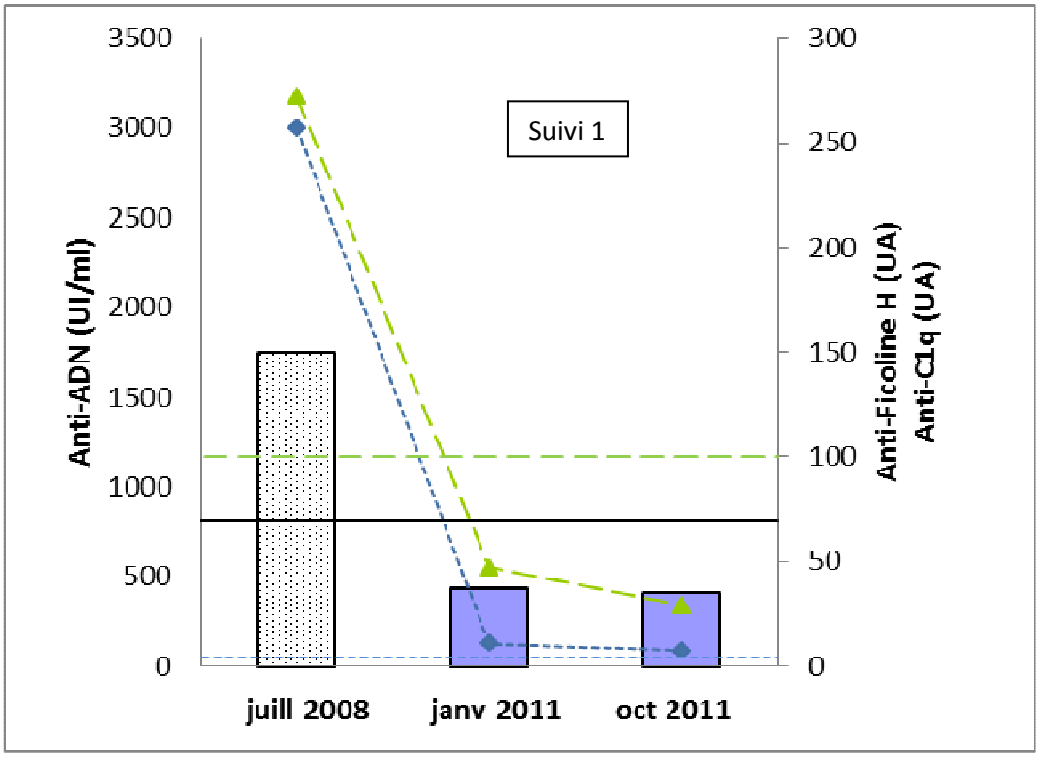
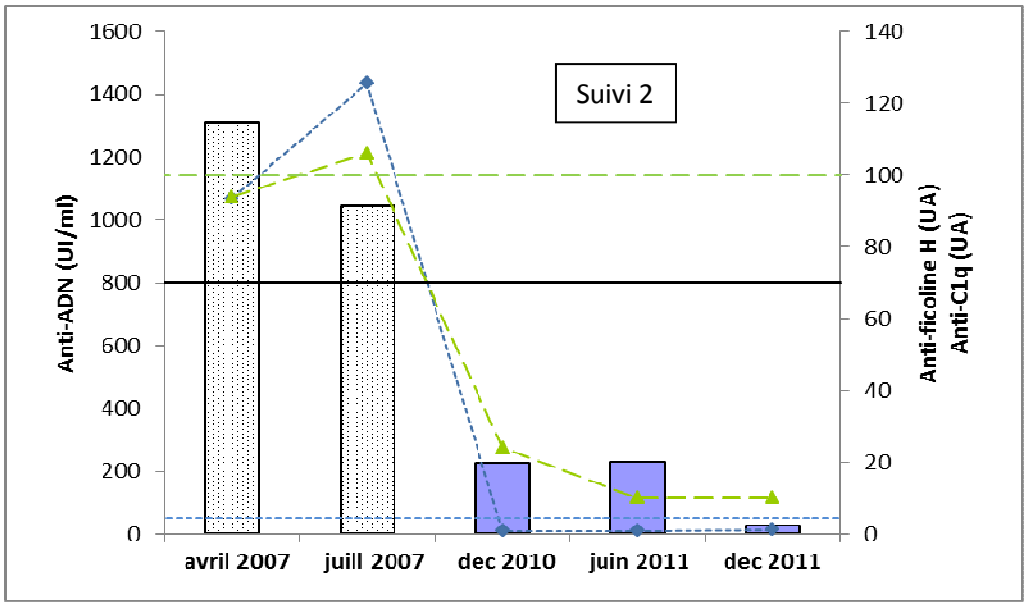


Figure 22 (1) : Suivi des anticorps anti-ficoline H, anti-C1q et anti-ADN chez des patients présentant des poussées de néphrite lupique



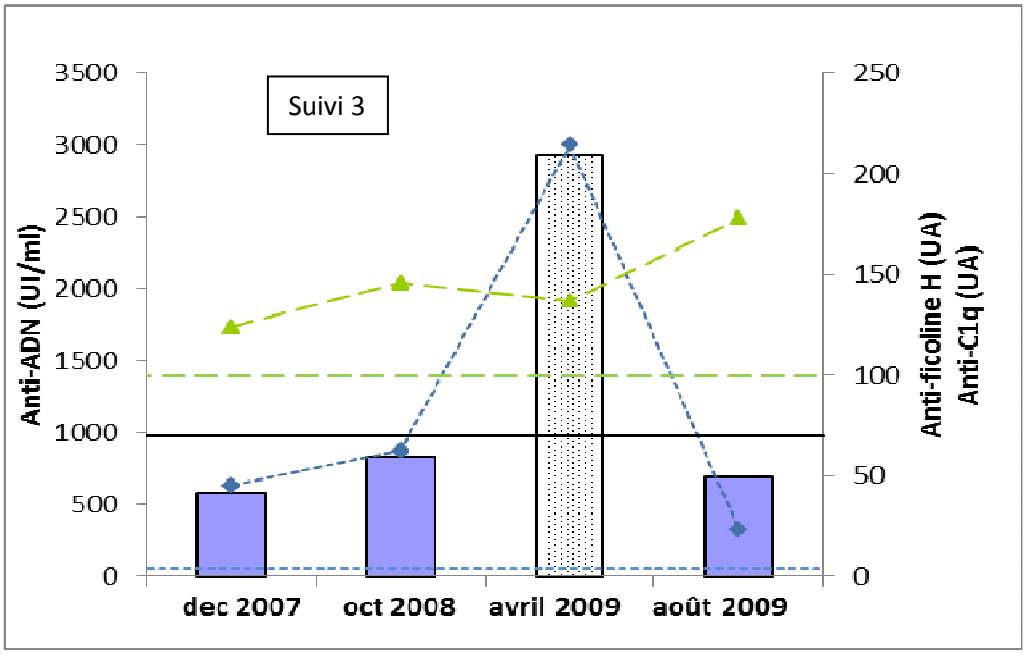
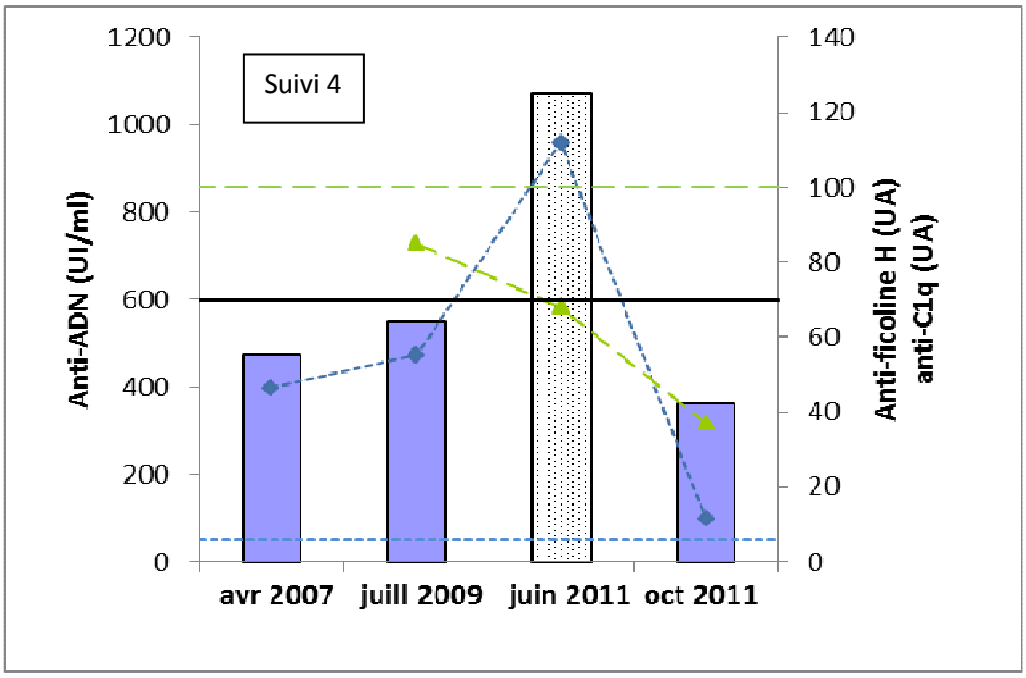


Figure 22 (2) : Suivi des anticorps anti-ficoline H, anti-C1q et anti-ADN chez des patients présentant des poussées de néphrite lupique



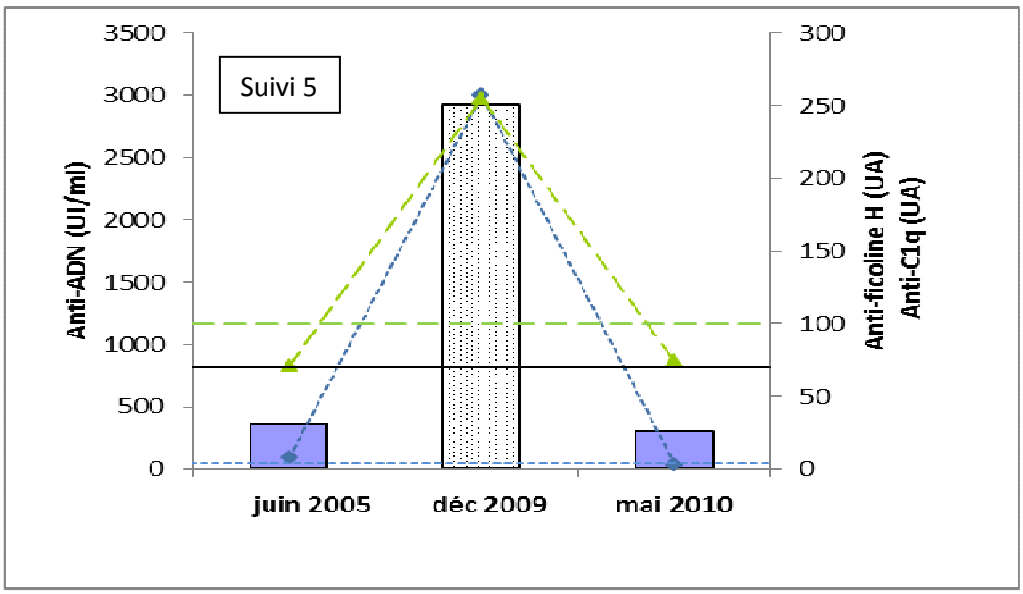


Figure 22 (3) : Suivi des anticorps anti-ficoline H, anti-C1q et anti-ADN chez des patients présentant des poussées de néphrite lupique

Donc chez ces 5 patients ce sont les anticorps anti-ficoline H qui sont les mieux corrélés aux poussées de néphrite lupique.

DISCUSSION et CONCLUSION

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif principal de cette étude a été d'évaluer l'intérêt du dosage des anticorps anti-ficoline H chez les patients lupiques. Nous avons montré que ces anticorps sont présents de façon significative chez les patients lupiques par rapport aux sujets sains (p = 0,0001), puis, que les taux de ces anticorps sont corrélés à l'activité lupique définie par le SLEDAI (« Systemic lupus erythematosus disease activity index ») (p = 0,0184). Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-ficoline H sont intéressants pour le diagnostic du lupus et pour le suivi de certains patients lupiques en complément de la clinique.

L'intérêt des anticorps anti-ADN double brin chez les patients lupiques. Pour le diagnostic et le suivi du lupus le dosage des anticorps anti-ADN double brin est le plus répandu. Les résultats obtenus pour ces anticorps sont très variables en fonction des tests [6] [33] [52] [13]. Notre objectif secondaire était de comparer deux trousses de dosage d'anticorps anti-ADN double brin chez des patients lupiques : la trousse ELISA Inova™ et la trousse ELISA Bio-rad™. Pour le suivi de ces patients les anticorps anti-ADN double brin dosés par la trousse Bio-rad™ sont bien corrélés au SLEDAI (p = 0,001) alors que ceux dosés par la trousse Inova™ ne le sont pas (p = 0,323). Ainsi, comme attendu, entre 2 tests ELISA, le dosage des anticorps anti-ADN double brin montre des résultats différents.

Le SLEDAI et ses limites. Parmi les nombreux scores d'évaluation du lupus [82] le SLEDAI est répandu et facile d'utilisation mais présente quelques défauts [10] (annexe 1). Il ne prend pas en compte la sévérité de l'atteinte d'un organe et donc dans le temps son amélioration ou son aggravation. C'est un score très global [86]. De plus, le dosage des anticorps anti-ADN est inclus dans le SLEDAI et sa variabilité influence la pertinence de ce score. Ainsi, si nous éliminons le paramètre anticorps anti-ADN du SLEDAI nous obtenons un SLEDAI modifié [59] ; cela permet d'estimer le poids de ces anticorps dans le SLEDAI. Chez les patients lupiques étudiés, la corrélation des anticorps anti-ADN dosés par la trousse Bio-rad™ avec le SLEDAI modifié est très faible (p = 0,0476). Pour le suivi des patients la trousse Bio-rad™ n'est donc pas aussi pertinente qu'à première vue. Par contre, après modification,

les anticorps anti-ADN Inova™ restent non corrélés au SLEDAI (p = 0,16) et les anticorps anti-ficoline H sont toujours corrélés au SLEDAI (p = 0,01).

Les marqueurs biologiques des complications du lupus. Parmi les marqueurs biologiques du lupus, le dosage des anticorps anti-ADN donne de meilleurs résultats pour le diagnostic que pour le suivi du lupus [6] [33] [48] [52]. Il existe un manque de marqueurs biologiques pour le suivi du lupus.

Comme nous l'avons vu les anticorps anti-ficoline H sont corrélés à l'activité du lupus ; or les anticorps anti-ADN (Bio-rad™) et les anticorps anti-ficoline H ne sont pas corrélés (p=0,0879). Les anticorps anti-ficoline H ont donc une originalité par rapport aux anticorps anti-ADN, ce qui en fait un marqueur intéressant pour certains patients mal suivis par les anticorps anti-ADN.

A l'inverse des anticorps anti-ADN, les anticorps anti-C1q sont corrélés aux anticorps anti-ficoline H (p = 0,0006). Or Il est admis dans la littérature que les anticorps anti-C1q ont une bonne valeur prédictive négative pour la néphrite lupique active [46] [65] [79] , il a donc été intéressant d'évaluer la corrélation des anticorps anti-ficoline H avec différents types de poussées et en particulier en cas de poussée rénale.

Parmi les 136 patients inclus dans l'étude, 50 présentaient un lupus actif lors du prélèvement ; ils présentaient différents types de poussées, 9 présentaient une néphrite lupique active. Il est intéressant de constater que dans ce groupe de patients en poussée, nous retrouvons une corrélation des anticorps anti-ficoline H avec l'atteinte rénale (p = 0,0146).

Ces résultats se sont confirmés pour les quelques patients dont nous avions un suivi : pour différents types de poussées autres que rénales (articulaires, cutanées, cardiaques et hématologiques), les anticorps anti-ficoline H ne varient pas de façon concomitante à l'alternance poussée / rémission. Par contre, pour 5 patients présentant une poussée rénale au cours de leur suivi, la corrélation entre positivité des anticorps anti-ficoline H et poussée rénale et négativité des anticorps anti-ficoline H et absence de poussée rénale est très bonne.

Afin de conclure de façon plus certaine, il est important de réaliser une nouvelle étude prospective, plus puissante statistiquement. Dans cette étude, pour le suivi des patients inclus, des critères cliniques stricts sont à définir, notamment en ce qui concerne la néphrite lupique. En effet, dans notre étude elle n'a pas été définie par des critères stricts. Il serait aussi souhaitable qu'un plus grand nombre de patients présentant des poussées de néphrites lupiques soient inclus. Par ailleurs, une étude prospective permettrait une

meilleure gestion de la conservation des sérums, notre étude étant rétrospective les sérums ont pu être parfois décongelés antérieurement.

Une perspective pour le suivi du lupus. Les anticorps anti-ADN, anti-C1q et anti-ficoline H malgré parfois une positivité concomitante associée à la clinique, ont chacun leur originalité. En faisant un panel d'anticorps pour le suivi des patients et en suivant leur évolution on aurait ainsi sans doute le plus de chance de détecter au plus tôt les poussées à venir. Nous pouvons imaginer restreindre le panel au bout de quelques temps en fonction du profil d'anticorps du patient.

Spécificité des anticorps anti-ficoline H. Nous avons mis en évidence la présence d'anticorps anti-ficoline H chez les patients lupiques comparativement aux sujets sains. Cependant, pour évaluer l'intérêt des anticorps anti-ficoline H dans le diagnostic du lupus, il est nécessaire de les rechercher chez des patients atteints d'autres maladies auto-immunes telles la polyarthrite rhumatoïde, la sclérodermie... Nous déterminerons ainsi la présence ou l'absence de spécificité des anticorps anti-ficoline H pour le lupus.

Sur le plan technique. Dans notre travail, c'était le témoin positif qui servait de référence entre les manipulations pour que les densités optiques des ELISA (« Enzyme linked immunosorbent assay ») soient comparables d'une plaque à l'autre. Dans une nouvelle étude, un « cut-off » (sérum constitué d'un « pool » correspondant au seuil de positivité et inclus dans chaque manipulation) devra être constitué et inclus dans chaque manipulation. De plus, Le seuil de positivité pourrait être réévalué sur une plus grande population de sujets sains et en les appariant en âge et en sexe avec la population de patients lupiques.

Rôle physiopathologique. Une hypothèse sur le rôle des anticorps anti-ficoline H dans la physiopathologie du lupus est qu'ils neutralisent la fonction de la ficoline H. Or celle-ci aurait un rôle protecteur dans l'apparition des complications rénales, car elle participe à l'élimination des cellules apoptotiques [37]. Cette hypothèse est actuellement étudiée en collaboration avec le docteur N. Thielens (Institut de Biologie Structurale).

Pour conclure, les anticorps anti-ficoline H semblent représenter un marqueur biologique intéressant chez les patients lupiques à qui ils pourraient apporter un plus dans le diagnostic et dans le suivi, en particulier rénal. Ces conclusions doivent être confortées par de nouvelles

études ciblées pour préciser l'intérêt de ce marqueur à la fois en pratique clinique et pour expliquer la physiopathologie du lupus.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le 26/08/2013

LE DOYEN

Professeur J.P. ROMANET

LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur J.Y. CESBRON

ANNEXE

Annexe 1 : le SLEDAI [10]

Valeur	score SLEDAI	**Symptôme / signe**	**Définition**
8	____	Convulsion	Début récent. Absence de cause métabolique, infectieuse ou médicamenteuse.
8	____	Psychose	Perturbation des activités quotidiennes normales, liée à un trouble sévère de la perception de la réalité, dont hallucinations, incohérence, perte des associations d'idées, appauvrissement du contenu de la pensée, pensées illogiques, comportement bizarre, désorganisé ou catatonie. Absence d'insuffisance rénale aiguë ou de cause médicamenteuse.
8	____	Syndrome cérébral organique	Altération fluctuante des fonctions cognitives d'apparition rapide, avec désorientation, troubles de la mémoire ou des autres fonctions supérieures, dont obscurcissement des idées avec difficultés de concentration et incapacité de prêter attention à son environnement, et au moins deux des signes suivants: trouble de la perception, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, ou augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice. Absence de cause métabolique, infectieuse ou médicamenteuse.
8	____	Trouble visuel	Anomalies rétiniennes liées au lupus, dont corps cytoides, hémorragies rétiniennes, exsudat séreux ou hémorragies choroïdiennes, ou névrite optique. Absence d'hypertension, de cause infectieuse ou médicamenteuse.
8	____	Atteinte des nerfs crâniens	Apparition récente d'une neuropathie sensitive ou motrice des nerfs crâniens.
8	____	Céphalées lupiques	Céphalées intenses, persistantes, parfois migraineuses, mais résistantes aux morphiniques.
8	____	AVC	AVC récent(s). Absence d'athérosclérose.
8	____	Vascularite	Ulcération, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus péri-unguéal, hémorragie sous ungéale ou vascularite prouvée par biopsie ou angiographie.
4	____	Arthrites	Plus de deux articulations douloureuses et inflammatoires (palpation douloureuse, gonflement, épanchement...).
4	____	Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale, associée à une élévation des CPK ou de l'aldolase ou à des modifications de l'électromyogramme, ou à une preuve histologique de myosite.
4	____	Cylindres urinaires	Cylindres granuleux ou hématiques
4	____	Hématurie	> 5 hématies/champs (grossissement max). Absence de lithiase, d' infection ou d'autres causes…
4	____	Protéinurie	> 0.5 g/24h. Apparition ou augmentation récente de plus de 0.5 g/24h.
4	____	Leucocyturie	> 5 leucocytes/champs (grossissement max). Absence d'infection.
2	____	Nouveau rash	Apparition ou récidive d'un rash inflammatoire.
2	____	Alopécie	Apparition ou récidive d'une perte de cheveux anormale, diffuse ou en plaque.
2	____	Ulcération des muqueuses	Apparition ou récidive d'ulcérations orales ou nasales.
2	____	Pleurésie	Douleur thoracique de type pleurale avec frottement, épanchement, ou épaississement pleural.
2	____	Péricardite	Douleur péricardique avec au moins un des signes suivants: frottement, épanchement, ou confirmation à l'ECG ou à l'échographie.
2	____	Baisse du complément	Diminution de CH50, C3, ou C4 en dessous de la valeur normale inférieure.
2	____	Augmentation des anticorps anti-ADN	Test de Farr positif (selon la norme du laboratoire).
1	____	Fièvre	> 38℃. Absence de cause infectieuse.
1	____	Thrombocytopénie	< 100 000 plaquettes/mm^3.
1	____	Leucopénie	< 3 000 leucocytes/mm^3. Absence de cause médicamenteuse.
score total	____		

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1 - Aarden, L. A., E. R. de Groot, et al. (1975). "Immunology of DNA. III. Crithidialuciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique." Ann N Y AcadSci**254**: 505-15.

2 - Akaiwa, M., Y. Yae, et al. (1999). "Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile." J HistochemCytochem**47**(6): 777-86.

3- Akhter, E., R. W. Burlingame, et al. (2011). "Anti-C1q antibodies have higher correlation with flares of lupus nephritis than other serum markers." Lupus**20**(12): 1267-74.

4- Almoallim, H., Y. Al-Ghamdi, et al. (2012). "Anti-Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Systemic Lupus Erythematosus." Open Rheumatol J 6: 315-9.

5- Andersen, T., L. Munthe-Fog, et al. (2009). "Serum levels of ficolin-3 (Hakata antigen) in patients with systemic lupus erythematosus." J Rheumatol**36**(4): 757-9.

6- Antico, A., S. Platzgummer, et al. (2010). "Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test." Lupus**19**(8): 906-12.

B

7- Bertsias, G., J. P. Ioannidis, et al. (2008). "EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics." Ann Rheum Dis**67**(2): 195-205.

8- Bizzaro, N., D. Villalta, et al. (2012). "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**12**(2): 97-106.

9- Boldt, A. B., I. Goeldner, et al. (2012). "Relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases." Adv Clin Chem**56**: 105-53.

10- Bombardier, C., D. D. Gladman, et al. (1992). "Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE." Arthritis Rheum**35**(6): 630-40.

11- Borchers, A. T., S. M. Naguwa, et al. (2010). "The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus." Autoimmun Rev**9**(5): A277-87.

12- Borchers, A. T., N. Leibushor, et al. (2012). "Lupus nephritis: a critical review." Autoimmun Rev**12**(2): 174-94.

C

13- Canonne, S.. (2001). "Détection des anticorps Anti-ADNnatif pour le diagnostic du lupus érythémateux systémique, étude comparative de 7 Trousses de dosage immuno-enzymatique et d'un test de Farr." thèse du laboratoire d'immunologie CHRU Lille.

14- Carroll, M. C. (2004). "A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus." Nat Rev Immunol**4**(10): 825-31.

15- Cavallo, T., W. R. Cameron, et al. (1977). "Immunopathology of early and clinically silent lupus nephropathy." Am J Pathol**87**(1): 1-18.

16- Chrétien, P.. (2012). "Les anticorps anti-ADN." Rev francophone des laboratoires**444 bis**: 16-17.

17- Churg, J., J. Bernstein, et al. (1995). "Renal disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease." 2nd edn Igaku-Shoin.

D

18- Defranco, A. L., R. M. Locksley, et al. (2002). "Innate recognition by soluble collectins." Immunity: the immune response to infection chap 2, p2, New Science Press Ltd, London.

19- Duus, K., N. M. Thielens, et al. (2010). "CD91 interacts with mannan-binding lectin (MBL) through the MBL-associated serine protease-binding site." Febs J**277**(23): 4956-64.

E

20- Egner, W. (2000). "The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE." J Clin Pathol**53**(6): 424-32.

21- Ehrenstein, M. R., D. R. Katz, et al. (1995). "Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice." Kidney Int**48**(3): 705-11.

22- Endo, Y., M. Matsushita, et al. (2011). "The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity." Int J Biochem Cell Biol**43**(5): 705-12.

F

23- Flierman, R. and M. R. Daha (2007). "The clearance of apoptotic cells by complement." Immunobiology**212**(4-5): 363-70.

24- Font, J., R. Cervera, et al. (2004). "Clusters of clinical and immunologic features in systemic lupus erythematosus: analysis of 600 patients from a single center." Semin Arthritis Rheum**33**(4): 217-30.

25- Forger, F., T. Matthias, et al. (2004). "Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis." Lupus**13**(1): 36-44.

G

26- Garlatti, V., N. Belloy, et al. (2007). "Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins." Embo J**26**(2): 623-33.

27- Goetz, J.. (2012). "Conduite à tenir devant la mise en évidence d'anticorps antinucléaires sur HEp2." Rev francophone des laboratoires**444 bis**: 7-11.

28- Goetz, J.. (2005). "Marqueurs biologiques anciens et modernes du lupus érythémateux systémique." Rev du rhumatisme**72**: 134-141.

29- Gomez-Puerta, J. A., R. W. Burlingame, et al. (2008). "Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value." Autoimmun Rev**7**(8): 606-11.

30- Gonzalez-Crespo, M. R., J. I. Lopez-Fernandez, et al. (1996). "Outcome of silent lupus nephritis." Semin Arthritis Rheum**26**(1): 468-76.

H

31- Hahn, B. H. (1998). "Antibodies to DNA." N Engl J Med**338**(19): 1359-68.

32- Hargraves, M. M., H. Richmond, et al. (1948). "Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell." Proc Staff Meet Mayo Clin**23**(2): 25-8.

33- Hernando, M., C. Gonzalez, et al. (2002). "Clinical evaluation of a new automated anti-dsDNA fluorescent immunoassay." Clin Chem Lab Med**40**(10): 1056-60.

34- Ho, A., L. S. Magder, et al. (2001). "Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum**44**(10): 2342-9.

35- Hochberg, M. C. (1997). "Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum**40**(9): 1725.

36- Holmskov, U., S.Thiel, et al. (2002). "Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate Immune defense." Annu Rev Immunol **21**: 547-78.

37- Honore, C., T. Hummelshoj, et al. (2007). "The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells." Arthritis Rheum**56**(5): 1598-607.

38- Hummelshoj, T., L. M. Fog, et al. (2008). "Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen)." Mol Immunol**45**(6): 1623-32.

I

39- Iida, K., R. Mornaghi, et al. (1982). "Complement receptor (CR1) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus." J Exp Med**155**(5): 1427-38.

40- Inaba, S., K. Okochi, et al. (1978). "On a new precipitating antibody against normal human serum found in two patients with SLE in Japanese." J Clin Exp Med**107**: 690-1.

41- Inaba, S., K. Okochi, et al. (1990). "Serological studies of an SLE-associated antigen-antibody system discovered as a precipitation reaction in agarose gel: the HAKATA antigen-antibody system." Fukuoka Igaku Zasshi**81**(9): 284-91.

42- Isenberg, D. A., J. J. Manson, et al. (2007). "Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?" Rheumatology (Oxford)**46**(7): 1052-6.

J

43- Johanet, C., C. André, et al. (2000). "Signification clinique des anticorps antiribosomes." Rev Méd Interne 21: 510-6

44- Jourde-Chiche, N., L. Daniel, et al. (2012). "Association between anti-C1q antibodies and glomerular tuft necrosis in lupus nephritis." Clin Nephrol**77**(3): 211-8.

K

45- Kallenberg, C. G. (2008). "Anti-C1q autoantibodies." Autoimmun Rev**7**(8): 612-5.

46- Katsumata, Y., K. Miyake, et al. (2011). "Anti-C1q antibodies are associated with systemic lupus erythematosus global activity but not specifically with nephritis: a controlled study of 126 consecutive patients." Arthritis Rheum**63**(8): 2436-44.

47- Katz, U. and G. Zandman-Goddard (2010). "Drug-induced lupus: an update." Autoimmun Rev**10**(1): 46-50.

48- Kavanaugh, A. F. and D. H. Solomon (2002). "Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests." Arthritis Rheum**47**(5): 546-55.

49- Koffler, D., P. H. Schur, et al. (1967). "Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus." J Exp Med**126**(4): 607-24.

50- Krarup, A., U. B. Sorensen, et al. (2005). "Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin." Infect Immun**73**(2): 1052-60.

51- Kuraya, M., Z. Ming, et al. (2005). "Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation." Immunobiology**209**(9): 689-97.

L

52- Launay, D., J. Schmidt, et al. (2010). "Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and Crithidia luciliae immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus." Clin Chim Acta**411**(13-14): 959-64.

53- Lemarié, R., F. Jacomet, et al. (2011). "Les anticorps anti-ADN natif : validation d'une stratégie de détection en deux temps." Ann Biol Clin **69** (1): 47-53.

54- Liphaus, B. L. and M. H. Kiss (2010). "The role of apoptosis proteins and complement components in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus." Clinics (Sao Paulo)**65**(3): 327-33.

55- Lu, J., C. Teh, et al. (2002). "Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system." Biochim Biophys Acta**1572**(2-3): 387-400.

M

56- Macanovic, M., M. B. Hogarth, et al. (1999). "Anti-DNA antibodies in the urine of lupus nephritis patients." Nephrol Dial Transplant**14**(6): 1418-24.

57- Maddison, P. J. (1982). "ANA-negative SLE." Clin Rheum Dis**8**(1): 105-19.

58- Mahler, M., K. Miyachi, et al. (2012). "The clinical significance of autoantibodies to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA)." Autoimmun Rev**11**(10): 771-5.

59- Martin, J., C. Durant, et al. (2011). "Evaluation of two antibodies against double-stranded DNA assays in discriminating between active and non-active systemic lupus erythematosus: correlation between the cut-off and the specificity." Pathol Biol (Paris)**60**(6): 387-91.

60- Matrat, A., C. Veysseyre-Balter, et al. (2011). "Simultaneous detection of anti-C1q and anti-double stranded DNA autoantibodies in lupus nephritis: predictive value for renal flares." Lupus**20**(1): 28-34.

61- Matsushita, M., Y. Endo, et al. (1996). "A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin." J Biol Chem**271**(5): 2448-54.

62- Matsushita, M., M. Kuraya, et al. (2002). "Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen)." J Immunol**168**(7): 3502-6.

63- Matsushita, M., Y. Endo, et al. (2013). "Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication." Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**61**(4): 273-83.

64- McCloskey, L. J., P. Christner, et al. (2010). "Myth and reality: practical test system for the measurement of anti-DNA antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE)." J Clin Lab Anal**24**(2): 77-84.

65- Meyer, O. C., P. Nicaise-Roland, et al. (2009). "Anti-C1q antibodies antedate patent active glomerulonephritis in patients with systemic lupus erythematosus." Arthritis Res Ther**11**(3): R87.

66- Meyer, O. C., M. F. Khan. (2000). "Lupus érythémateux systémique." Maladies et syndromes systémiques : 131-368 bis.

67- Michalski, M., A. Szala, et al. (2012). "H-ficolin (ficolin-3) concentrations and FCN3 gene polymorphism in neonates." Immunobiology**217**(7): 730-7.

68- Migliorini, P., C. Baldini, et al. (2005). "Anti-Sm and anti-RNP antibodies." Autoimmunity**38**(1): 47-54.

69- Miyachi, K., M. J. Fritzler, et al. (1978). "Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells." J Immunol**121**(6): 2228-34.

70- Monticielo, O. A., T. Mucenic, et al. (2008). "The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus." Clin Rheumatol**27**(4): 413-9.

O

71- Ogden, C. A., A. deCathelineau, et al. (2001). "C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells." J Exp Med**194**(6): 781-95.

72- Okamura, M., Y. Kanayama, et al. (1993). "Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology." Ann Rheum Dis**52**(1): 14-20.

73- Op De Beeck, K., P. Vermeersch, et al. (2011). "Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay." Autoimmun Rev**10**(12): 801-8.

P

74- Palaniyar, N., J. Nadesalingam, et al. (2004). "Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin." J Biol Chem**279**(31): 32728-36.

75- Pascual, V., L. Farkas, et al. (2006). "Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons." Curr Opin Immunol**18**(6): 676-82.

76- Paul, L., V. M. Skanes, et al. (1988). "C4-mediated inhibition of immune precipitation and differences in inhibitory action of genetic variants, C4A3 and C4B1." Complement**5**(3): 110-9.

77- Pesce, A. J., N. Mendoza, et al. (1974). "Use of enzyme-linked antibodies to measure serum anti-DNA antibody in systemic lupus erythematosus." Clin Chem**20**(3): 353-9.

78- Pincus, T.,P. H. Schurr, et al. (1968). "A diagnostic test for systemic lupus erythematosus using a DNA binding essay." Arth Rheum: 837-839.

79- Potlukova, E. and P. Kralikova (2008). "Complement component c1q and anti-c1q antibodies in theory and in clinical practice." Scand J Immunol**67**(5): 423-30.

R

80- Radanova, M., V. Vasilev, et al. (2012). "Anti-C1q autoantibodies specific against the globular domain of the C1qB-chain from patient with lupus nephritis inhibit C1q binding to IgG and CRP." Immunobiology**217**(7): 684-91.

81- Ravirajan, C. T., L. Rowse, et al. (2001). "An analysis of clinical disease activity and nephritis-associated serum autoantibody profiles in patients with systemic lupus erythematosus: a cross-sectional study." Rheumatology (Oxford)**40**(12): 1405-12.

82- Romero-Diaz, J., D. Isenberg, et al. (2011). "Measures of adult systemic lupus erythematosus: updated version of British Isles Lupus Assessment Group (BILAG 2004), European Consensus

Lupus Activity Measurements (ECLAM), Systemic Lupus Activity Measure, Revised (SLAM-R), Systemic Lupus Activity Questionnaire for Population Studies (SLAQ), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K), and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SDI)." Arthritis Care Res (Hoboken)**63 Suppl 11**: S37-46.

S

83- Sato, N., I. Ohsawa, et al. (2011). "Significance of glomerular activation of the alternative pathway and lectin pathway in lupus nephritis." Lupus**20**(13): 1378-86.

84- Seelen, M. A., L. A. Trouw, et al. (2003). "Diagnostic and prognostic significance of anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus." Curr Opin Nephrol Hypertens**12**(6): 619-24.

85- Seligmann, M. (1957). "[Demonstration in the blood of patients with disseminated lupus erythematosus a substance determining a precipitation reaction with desoxyribonucleic acid]." C R Hebd Seances Acad Sci**245**(2): 243-5.

86- Seror, R.. (2012). "Critères de jugement et maladies systémiques, mesure de l'activité du lupus érythémateux systémique." DIU maladies systémiquesHôpital Bicêtre.

87- Sjoholm, A. G., G. Jonsson, et al. (2006). "Complement deficiency and disease: an update." Mol Immunol**43**(1-2): 78-85.

88- Su, Y., R. L. Jia, et al. (2007). "Role of anti-nucleosome antibody in the diagnosis of systemic lupus erythematosus." Clin Immunol**122**(1): 115-20.

89- Sugimoto, R., Y. Yae, et al. (1998). "Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family." J Biol Chem**273**(33): 20721-7.

90- Suh-Lailam, B. B., T. R. Chiaro, et al. (2011) "Evaluation of a high avidity anti-dsDNA IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus." Int J Clin Exp Pathol**4**(8): 748-54.

91- Sui, M., Q. Lin, et al. (2013). "Simultaneous positivity for anti-DNA, anti-nucleosome and anti-histone antibodies is a marker for more severe lupus nephritis." J Clin Immunol**33**(2): 378-87.

92- Swierzko, A., J. Lukasiewicz, et al. (2012). "New functional ligands for ficolin-3 among lipopolysaccharides of Hafnia alvei." Glycobiology**22**(2): 267-80.

T

93- Takahashi, K., W. E. Ip, et al. (2006). "The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule." Curr Opin Immunol**18**(1): 16-23.

94- Takahashi, M., B. F. Tack, et al. (1977). "Requirements for the solubilization of immune aggregates by complement: assembly of a factor B-dependent C3-convertase on the immune complexes." J Exp Med**145**(1): 86-100.

95- Takahashi, R., A. Tsutsumi, et al. (2004). "Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus." Clin Exp Immunol**136**(3): 585-90.

96- Tozzoli, R., N. Bizzaro, et al. (2002). "Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases." Am J Clin Pathol**117**(2): 316-24.

97- Trendelenburg, M. (2005). "Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus." Springer Semin Immunopathol**27**(3): 276-85.

98- Truedsson, L., A. A. Bengtsson, et al. (2007). "Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus." Autoimmunity**40**(8): 560-6.

U

99- Uwatoko, S., S. Aotsuka, et al. (1984). "Characterization of C1q-binding IgG complexes in systemic lupus erythematosus." Clin Immunol Immunopathol**30**(1): 104-16.

V

100- Verma, A., M. White, et al. (2012). "Human H-ficolin inhibits replication of seasonal and pandemic influenza A viruses." J Immunol**189**(5): 2478-87.

W

101- Wakasugi, D., T. Gono, et al. (2012). "Frequency of class III and IV nephritis in systemic lupus erythematosus without clinical renal involvement: an analysis of predictive measures." J Rheumatol**39**(1): 79-85.

102- Watanabe, H., R. Saito, et al. (2012). "Serum L-ficolin levels in patients with systemic lupus erythematosus." Mod Rheumatol**22**(6): 899-902.

103- Weening, J. J., V. D. D'Agati, et al. (2004). "The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited." Kidney Int**65**(2): 521-30.

104- Weiss, L.. (2000). "Biologie des déficits en complément." Méd thérapeutique **6** (2): 155-161.

105- Wold, R. T., F. E. Young, et al. (1968). "Deoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with deoxyribonucleic acid." Science**161**(3843): 806-7.

Y

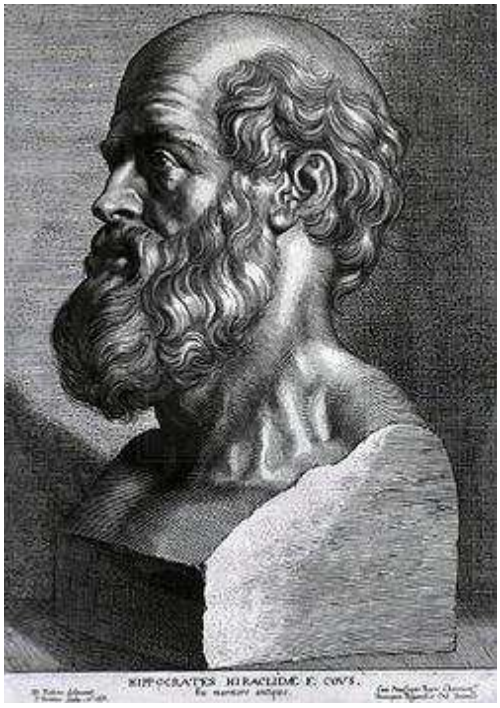
106- Yamada, M., K. Oritani, et al. (2004). "Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells." Eur J Immunol**34**(1): 221-30.

107- Yoshizawa, S., K. Nagasawa, et al. (1997). "A thermolabile beta 2-macroglycoprotein (TMG) and the antibody against TMG in patients with systemic lupus erythematosus." Clin Chim Acta**264**(2): 219-25.

Z

108- Zacho, R. M., L. Jensen, et al. (2012). "Studies of the pattern recognition molecule H-ficolin: specificity and purification." J Biol Chem**287**(11): 8071-81.

109- Zhang, X. L. and M. A. Ali (2008). "Ficolins: structure, function and associated diseases." Adv Exp Med Biol**632**: 105-15.



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,
Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.
Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.
Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs, ni à favoriser le crime.
Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.
Je garderai le respect absolu de la vie humaine.
Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.
Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.