

Lupus érythémateux systémique et anticorps anti-ADN natif : comparaison de méthodes entre un ELISA " maison " et des techniques automatisées

Mickaël Martinet

▶ **To cite this version:**

Mickaël Martinet. Lupus érythémateux systémique et anticorps anti-ADN natif : comparaison de méthodes entre un ELISA " maison " et des techniques automatisées. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03052776

HAL Id: dumas-03052776

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03052776

Submitted on 10 Dec 2020

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 CAEN NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(Spécialité DES Biologie Médicale)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Lupus érythémateux systémique et anticorps anti-ADN natif : comparaison de méthodes entre un ELISA « maison » et des techniques automatisées

Présenté par
Mickael MARTINET

Soutenue publiquement le 15 juin 2020
devant le jury composé de

Pr Pascale SCHUMANN-BARD	Professeur des Universités – UFR Santé Caen	Présidente du jury
Dr Elisabeth COMBY	Praticien Hospitalier – Laboratoire d'Immunologie – CHU de Caen	Directrice de thèse
Pr Brigitte LE MAUFF	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier – Laboratoire d'Immunologie – CHU de Caen	Examinateur
Dr Delphine MARIOTTE	Praticien Hospitalier – Laboratoire d'Immunologie – CHU de Caen	Examinateur
Dr Victor Gueutin	Praticien Hospitalier – Service de Néphrologie – CH de Flers	Examinateur

Thèse dirigée par le Dr Elisabeth COMBY

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs
Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel ..... Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan ..... Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie ..... Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick ..... Chimie médicinale
DAUPHIN François ..... Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël ..... Chimie analytique
FABIS Frédéric ..... Chimie organique
FRERET Thomas ..... Physiologie, Pharmacologie
GARON David ..... Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe ..... Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie ..... Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe ..... Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale ..... Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François ..... Toxicologie
SOPKOVA Jana ..... Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie ..... Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR ..... Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR ..... Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR ..... Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR ..... Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne ..... Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR ..... Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire ..... Pharmacie galénique
KIEFFER Charline ..... Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier)**– HDR** ..... Biologie clinique

LAPORTE-WOJCIK Catherine..... Chimie bio-inorganique

LEBAILLY Pierre – HDR..... Santé publique

LECHEVREL Mathilde – HDR ..... Toxicologie

LEGER Marianne..... Physiologie, Pharmacologie

LEPAILLEUR Alban – HDR..... Modélisation moléculaire

N'DIAYE Monique ..... Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique

PAIZANIS Eleni..... Physiologie, Pharmacologie

PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima ..... Chimie organique et thérapeutique

POTTIER Ivannah..... Chimie et toxicologie analytiques

PREVOST Virginie – HDR ..... Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient

QUINTIN Jérôme..... Pharmacognosie

RIOULT Jean-Philippe..... Botanique, Mycologie, Biotechnologies

SINCE Marc ..... Chimie analytique

VILLEDIEU Marie – HDR ..... Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie..... Anglais

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume ..... Pharmacie clinique

SEDILLO Patrick ..... Pharmacie officinale

RICHARD Estelle ..... Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

A Madame le **Professeur Pascale SCHUMAN-BARD**, de me faire l'honneur de présider ce jury. Vous m'avez enseigné la physiologie durant mon cursus de Pharmacie et m'avez épaulé durant les oraux des étudiants à l'UFR de Pharmacie, je vous en suis très reconnaissant.

A Madame le **Docteur Elisabeth COMBY**, de m'avoir fait partagé ta passion de l'auto-immunité et de m'avoir encadré pour la préparation et les corrections de cette thèse.

A Madame le **Professeur Brigitte LE MAUFF**, de m'avoir accueilli dans ton laboratoire durant une année et demie et de m'avoir fait confiance dans la pratique et la validation des examens d'immunologie durant cette période.

A Madame le **Docteur Delphine MARIOTTE**, d'avoir toujours été présente pour répondre à mes interrogations lors de mes stages dans le service d'Immunologie, et pour tes conseils avisés tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel.

A Monsieur le **Docteur Victor GUEUTIN**, de m'avoir aidé à constituer la cohorte de patients issus de votre service de Néphrologie, votre présence en tant que clinicien a été très précieuse.

A Madame le **Docteur KATHY Khoy**, pour ton écoute, pour ton aide à la programmation des automates, ainsi que pour tous ces moments de fous rires que nous avons partagés au laboratoire. Merci également pour les Symposiums de nouilles Dan-Dan et autres restaurants que tu m'as fait découvrir durant ces stages.

A tous les biologistes qui m'ont encadré et qui m'ont fait partagé la passion de leur métier, durant cet internat et qui ont toujours 5 minutes (voire plus !) pour papoter, notamment Frédérique, François, Christophe, Anne (qui est toujours restée zen !) et Meggie : merci pour votre pédagogie et vos précieux conseils, qui m'ont permis d'apprendre mon futur métier, dans la bonne humeur !

A François et Elsa, de m'avoir fait partager leur passion de la Recherche, vous avez toujours du temps à consacrer aux autres, merci ; une belle amitié que je compte entretenir.

A mes parents, Isabelle et Dominique, pour votre soutien durant toutes ces années d'études.

A ma grand-mère, Janine, merci d'être toujours à mon écoute dans les bons comme dans les mauvais moments. Nous sommes très proches depuis toujours, tu es ma première confidente, nous partageons beaucoup chaque fois que nous nous voyons.

A ma Tante, Eliane, qui m'a beaucoup apporté, je ne te serai jamais assez reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour nous, et même si la distance nous sépare et ne nous permet pas de nous voir autant que nous le voudrions, nous ne sommes jamais sans nous donner de nouvelles. Bonne retraite à toi, je crois que tu auras de quoi faire.

A mes frères, Alexandre et Thomas, pour les moments que nous avons partagés. Vous avez tous les deux trouvé votre voie, j'espère que vous vous épanouirez pleinement.

A Alexandre (alias Lelex) et Lucie (alias Lucette), votre amitié de longue date compte énormément pour moi, vous êtes toujours là en cas de besoin, comme une seconde famille en sommes !

A Agathe, alias Jackie, ou Dr Gueguette… nous nous sommes rencontrés lors de notre premier semestre et avons partagé beaucoup de bons moments ensemble, des fous rires, des potins, et même une coloc durant un semestre. Ne crois pas que tu te débarrasseras de moi après l'internat !

A Marine, alias mon M, tu fais également parti des très belles rencontres de cet internat. Ta bonne humeur et ta joie de vivre pourraient être brevetées comme antidépresseur naturel !

A Florent, Maxime, Sonia, Rachel, Chloé, Lolo, Dany, pour les soirées et tous les moments que nous partageons ensemble, vous comptez énormément.

Sommaire

Liste des abréviations 1

Liste des Figures 4

Liste des Tableaux 5

PARTIE 1 : MALADIE LUPIQUE, ETAT DES LIEUX 7

1. Introduction 7

1.1 Epidémiologie 7

1.2 Physiopathologie du LES 7

1.2.1 Facteurs génétiques 7

1.2.2 Facteurs environnementaux 8

1.2.3 Mécanismes 9

1.2.3.1 Apoptose et défaut d'élimination des auto-antigènes 9

1.2.3.2 Rôle des lymphocytes T 10

1.2.3.3 Rôle des lymphocytes B 11

1.2.3.4 Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes 12

1.2.3.5 Rôle des polynucléaires neutrophiles 13

1.2.3.6 Aspects lésionnels 13

1.3 Aspects cliniques du lupus 16

1.3.1 Manifestations cliniques 16

1.3.1.1 Altération de l'état général 17

1.3.1.2 Manifestations articulaires et osseuses 17

1.3.1.3 Manifestations cutanéomuqueuses 17

1.3.1.4 Manifestations rénales 17

1.3.1.1 Manifestations vasculaires 18

1.3.1.2 Manifestations thromboemboliques 18

1.3.1.3 Manifestations hématologiques 20

1.3.1.4 Autres manifestations 20

1.3.1.5 Cas particulier : le lupus induit 21

1.3.2 Critères de classification 21
1.3.2.1 Critères ACR/EULAR 21
1.3.2.2 Critères SLICC 23
1.3.2.3 Comparaison des performances 24
1.4 Paramètres biologiques du lupus : les auto-anticorps 24
1.4.1 Anticorps anti-noyau 24
1.4.2 Anticorps anti-ADN natif 25
1.4.2.1 Historique 25
1.4.2.2 Evolution des pratiques 27
1.4.2.3 Intérêt du dosage 27
1.4.2.4 Méthodes de dosage des IgG anti-ADNn 28
1.4.3 Autres auto-anticorps retrouvés dans le lupus 30
1.4.3.1 Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles 30
1.4.3.2 Anticorps anti-C1q 30
1.4.3.3 Anticorps anti-phospholipides 31
1.4.4 Autres marqueurs biologiques du lupus 31
1.4.4.1 Marqueurs hématologiques 31
1.4.4.2 Marqueurs inflammatoires 31
1.4.4.3 Système du complément 31
1.4.4.4 Marqueurs de dysfonction rénale 31
1.5 Traitements du LES 32
1.5.1 Approche pharmacologique 32
1.5.1.1 Les antipaludéens de synthèse 32
1.5.1.2 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens 33
1.5.1.3 Les corticoïdes 33
1.5.1.4 Les immunosuppresseurs 34
1.5.2 Prophylaxie - Règles hygiéno-diététiques 35
1.5.2.1 Vaccination 35
1.5.2.2 Protection solaire 35

1.5.2.3 Tabac 35
1.5.2.4 Contraception 35
1.5.2.5 Lupus et grossesse 36
1.6 Evolutivité de la maladie et pronostic 36
PARTIE 2 : DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-ADN NATIF 39
2. Matériels et méthodes 41
2.1 Population étudiée 41
2.1.1 Population lupique 42
2.1.2 Population non lupique 42
2.2 Techniques de dosage des anticorps anti-ADN natif comparées 43
2.2.1 ELISA « maison » 43
2.2.2 Techniques automatisées 44
2.2.2.1 Immunodosage par chimiluminescence 44
2.2.2.2 Immunodosage par émission de fluorescence 46
2.3 Autres éléments techniques 47
2.3.1 Expression des résultats 47
2.3.2 Gammes de mesure 47
2.3.3 Valeurs de référence 47
2.3.4 Interférences 48
2.3.5 Récapitulatif technique 48
2.4 Analyse des données 50
2.4.1 Analyse statistique 50
2.4.2 Calcul des performances 50
2.4.3 Construction des courbes ROC et calcul des index de Youden 51
2.4.4 Index Kappa ou concordance clinique 51
3. Résultats 53
3.1 Caractéristiques de la cohorte lupique 53
3.1.1 Epidémiologie 53
3.1.2 Caractéristiques cliniques au diagnostic 53

3.1.3 Paramètres biologiques 54
3.1.4 Traitements reçus 55
3.2 Anticorps anti-ADN natif 55
3.2.1 Résultats bruts par technique 55
3.2.2 Intérêt des dilutions 58
3.3 Ac anti-ADN dénaturé 58
3.4 Cas des néphropathies lupiques 59
3.5 Corrélation entre les tests 60
3.6 Performances initiales des tests 62
3.7 Courbes ROC 63
3.8 Performances calculées des tests 63
3.9 Concordance entre les tests 64
3.10 Cas discordants 65
3.10.1 Analyse des discordances d'une seule technique 65
3.10.2 Analyse des résultats 50% discordants 66
4. Discussion 69
4.1 Interprétation des résultats 69
4.1.1 Hétérogénéité des résultats 69
4.1.2 Comparaison des automates 71
4.1.2.1 Dosages CLIA sur les automates Bioflash et iSYS 71
4.1.2.2 Dosage Elia sur l'automate Phadia 71
4.2 Comparaison avec les données de la littérature 72
4.1 Avantages du changement de technique 74
4.1.1 Maintien d'un dosage de qualité 74
4.1.2 Gestion de la qualité assouplie 76
4.1.3 Passage à des tests unitaires et délai de rendu 76
4.1.4 Autres tests simultanés 76
4.2 Inconvénients attendus du changement de technique 77
4.2.1 Système fermé 77

4.2.2 Coût 77
4.2.3 Arrêt du dosage des anticorps anti-ADN dénaturé 77
4.3 Limites de l'étude 78
5. Conclusion 80
Bibliographie 81
VU, LE PRESIDENT DU JURY 94

Liste des abréviations

AAN : Anticorps anti-noyau

Ac : Anticorps

ACR : American College of Rheumatology

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNd : ADN dénaturé

ADNn : ADN natif

Ag : Antigène

AICD : Mort cellulaire après activation

ALBIA : Immunodosage par cytométrie de flux

APS : Anti-phospholipides

ARN : Acide ribonucléique

AUC : Aire sous la courbe

BCR : Récepteur du lymphocyte B

Blys : B lymphocyte stimulator

CCP : Peptide cyclique citrulliné

CD : Cluster de différenciation

CH50 : Activité du complément

CHU : Centre hospitalier universitaire

CI : Complexe immun

CLIFT : Immunofluorescence sur *Crithidia luciliae*

CLIA : Immunodosage avec réaction de chimiluminescence

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRP : Protéine C réactive

CQI : Contrôle de qualité interne

DC : Cellule dendritique

DO : Densité optique

EBV : Epstein Barr virus

Elia : Immunodosage avec réaction fluorimétrique

ELISA : Immunodosage avec réaction colorimétrique

ENA : Antigène nucléaire soluble

EULAR : Ligue européenne contre les rhumatismes

F : Fournisseur

FRM : Facteur rhumatoïde

GEM : Glomérulonéphrite extra-membraneuse

GHT : Groupement hospitalier de territoire

HCQ : Hydroxychloroquine

Hep2 : Human epithelial cell line type 2

kDa : Kilo Dalton

IFA : Immunofluorescence

IFN : Interferon

IL : Interleukine

ISN/RPS : Société internationale de néphrologie/Société rénale d'anatomopathologie

LA : Lupus systémique aigu

LA DG : Lupus systémique aigu au moment du diagnostic

LB : Lymphocyte B

LC : Lupus cutané

LI : Lupus induit

LRC : Lupus systémique en rémission complète

LRP : Lupus systémique en rémission partielle

LT : Lymphocyte T

LTreg : Lymphocyte T régulateur

LES : Lupus érythémateux systémique

MCTD : Connectivite mixte

NET : Neutrophil Extracellular Trap

NL : Néphrite lupique

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAL : Phosphatase alcaline

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde

PNN : Polynucléaire neutrophile

PNPP : Para-nitrophénylphosphate

RNP : Ribonucléoprotéine

SAPL : Syndrome des anti-phospholipides

Se : Sensibilité

SLEDAI : Systemic lupus erythematosus activity index

SLICC : Systemic lupus international collaborating clinics

Sm : Protéine Smith

SMR : Taux de mortalité standardisé

SNEC : Secondary necrotic cell

Spé : Spécificité

TCR : Récepteur du lymphocyte T

TLR : Toll-like récepteur

TNF : Tumor necrosis factor

UA : Unité arbitraire

UCTD : Connectivite indifférenciée

UI : Unité internationale

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

VS : Vitesse de sédimentation

Y : Youden

Liste des Figures

Figure 1 - Internalisation des auto-antigènes et acheminement jusqu'aux TLR endosomaux (d'après Marshak-Rothstein *et al.*[41]) 12
Figure 2 – Physiopathologie du LES (adapté de Kaul *et al.* [25]) 15
Figure 3 - Principe de IFI (d'après cri-net.com[82]) 24
Figure 4 - Fluorescence homogène observée en IFI au cours du lupus (source http://www.geai-lesautoAc.fr/50-Ac-antinucleacute-aires) 25
Figure 5 - Histoire des Ac anti-ADNn (issu de Mummert *et al.*[85]) 26
Figure 6 - Evolution (en pourcentage) de l'utilisation des techniques de dosages des anti-ADNn entre 2009 et 2017 (données UKNEQAS) (adapté de Mummert *et al.*[85]) 27
Figure 7 - Test de Farr (d'après memobio.fr) 28
Figure 8 - Interprétation de lecture en IFI des anti-ADNn sur Crithidia luciliae (d'après Soda *et al.*[93] et illustration issue de www.euroimmun.com) 29
Figure 9 - Principe d'un immunodosage sur support solide (d'après cri-net.com[82]) 29
Figure 10 - Mécanisme d'action de l'HCQ (d'après Schrezenmeier *et al.*[108]) 33
Figure 11 - Répartition des patients lupiques 42
Figure 12 - Répartition des patients non lupiques 42
Figure 13 - Réaction de chimiluminescence 44
Figure 14 - Automate Bioflash (source https://www.werfen.com/fr/fr/bio-flashr) 45
Figure 15 - Automate iSYS (source http://www.makgrouphealthcare.com/laboratory/) 45
Figure 16 - Automate Phadia 250 (source http://www.phadia.com) 46
Figure 17 - Répartition des patients par classe d'âge 53
Figure 18 – Représentation graphique de la répartition des Ac anti-ADNn pour chaque sous-groupes. 56
Figure 19 – Ac IgG anti-ADNd dans les différents sous-groupes de LES et non LES. 58
Figure 20 - Répartition des Ac anti-ADNn chez les patients NL+/NL- au diagnostic, pour chaque test 59
Figure 21 - Courbes ROC définies pour chaque technique 63
Figure 22 - Répartition des résultats discordants d'une seule technique lorsque les trois autres sont concordantes 66
Figure 23 - Corrélation de dosages d'Ac anti-ADNn entre deux techniques, sur trois sous-populations différentes (d'après Mummert *et al.*[85]) 70

Liste des Tableaux

Tableau 1 - Principaux gènes associés au lupus (adapté de Rasmussen *et al.*[9]) 8
Tableau 2 - Drogues inductrices de lupus et risque associé (d'après Rubin *et al.*[19]) 9
Tableau 3 – Auto-Ac du LES et manifestations cliniques associées (d'après Rahman *et al.*[1]) 14
Tableau 4 - Fréquence des manifestations cliniques présentes initialement et au cours du LES (adapté de Cervera *et al.*[56]) 16
Tableau 5 - Classification des néphropathies lupiques ISN/RPS (adapté de Weening *et al.*[69]) 19
Tableau 6 - Critères ACR révisés de 1997 (d'après le PNDS[59]) 21
Tableau 7 - Classification ACR/EULAR 2019 (d'après Aringer *et al.*[79]) 22
Tableau 8 - Critères SLICC (d'après le PNDS[59]) 23
Tableau 9 - Performances des critères de classification de LES (d'après Aringer *et al.*[79]) 24
Tableau 10 - Score SLEDAI (d'après Secor R[125]) 37
Tableau 11 - Niveau d'activité du LES selon le score SLEDAI 37
Tableau 12 - Gamme de dosage des Ac anti-ADNn pour les différents tests 47
Tableau 13 - Valeurs normales des tests, selon les notices fabricant ou seuil du laboratoire .. 48
Tableau 14 - Récapitulatif technique des différents tests 49
Tableau 15 - Indices de significativité évalués sur GraphPad 50
Tableau 16 - Tableau de contingence pour le calcul des performances des tests 51
Tableau 17 - Tableau de contingence pour le calcul de l'index Kappa 52
Tableau 18 - Interprétation du degré d'accord entre deux méthodes, selon l'index Kappa 52
Tableau 19 - Atteintes cliniques des patients inclus au diagnostic (LA DG) 54
Tableau 20 - Anomalies biologiques relevées, en pourcentage, par catégorie clinique 54
Tableau 21 - Traitements reçus par les patients selon la catégorie clinique de lupus 55
Tableau 22 - Médianes (Q2) et quartiles (Q1-Q3) des taux d'Ac IgG anti-ADNn, en U/mL . 57
Tableau 23 - Indices de significativité de la comparaison des taux médians entre chaque sous-groupes et pour chaque test 57
Tableau 24 - Médianes (Q2) et quartiles (Q1-Q3) des taux d'Ac IgG anti-ADNd, en UA/mL 59
Tableau 25 - Médianes (Q2) et quartiles (Q1-Q3) des taux d'Ac IgG anti-ADNn pour les néphrites lupiques au diagnostic, en UA/mL 60
Tableau 26 – Corrélations deux à deux des différentes techniques de dosage des Ac anti-ADNn 61

Tableau 27 – Récapitulatif des performances initiales (F) et calculées (Y)..... 62
Tableau 28 - Aires sous la courbe selon les tests 63
Tableau 29 - concordances entre les tests selon le type de seuil (F) ou (Y) choisi..... 64
Tableau 30 - Interprétation clinique des résultats discordants 67
Tableau 31 - Nombre de discordances des tests selon les critères définis et taux de discordance global..... 68
Tableau 32 - Performance des tests pour le dosage des Ac anti-ADNn recensés dans la littérature. En vert les techniques comparées dans cette étude. 75

PARTIE 1 : MALADIE LUPIQUE, ETAT DES LIEUX

1. Introduction

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie inflammatoire et auto-immune pouvant toucher différents organes. Secondaire à une perte de la tolérance vis-à-vis d'antigènes (Ag) du soi, il est clairement établi que le LES est une connectivite multifactorielle complexe qui résulte de l'imbrication de différents facteurs : génétiques, environnementaux et immunitaires, aboutissant à la formation de nombreux auto-anticorps (Ac) contre des Ag intracellulaires et nucléaires.

Les patients lupiques présentent des caractéristiques cliniques très polymorphes, allant d'une atteinte isolée des articulations et/ou de la peau à une atteinte plus systémique des systèmes rénal, cardiovasculaire, hématologique et/ou nerveux central. L'hétérogénéité clinique du LES et l'absence de critère pathognomonique peuvent en faire une maladie difficile à diagnostiquer, notamment lorsque les patients présentent des plaintes isolées non spécifiques (alopécie, douleurs articulaires…) ou des formes peu fréquentes de la maladie[1].

1.1 Epidémiologie

La prévalence du lupus est variable d'un pays à l'autre, allant de 45,2 à 178 cas pour 100 000 habitants[2]. Elle est plus élevée dans les populations Afro-Américaines que dans les populations caucasiennes. En France, selon les registres de l'assurance maladie, la prévalence est estimée à 47,1 cas pour 100 000 habitants dont 88 % de femmes[3].

1.2 Physiopathologie du LES

1.2.1 Facteurs génétiques

Plusieurs arguments plaident pour une contribution importante des facteurs génétiques dans la physiopathologie du lupus. En effet, le taux de concordance chez les jumeaux monozygotes varie de 24 à 69 % alors qu'il est de 2 à 9 % chez les jumeaux dizygotes. On remarque, par ailleurs, une forte agrégation familiale puisque 10 à 12 % des patients ayant un apparenté du premier degré atteint de lupus développeront la même maladie.[4,5]

Certaines mutations, qui restent rares, comme celles touchant les protéines impliquées dans la voie classique du complément (C1q, C2, C4), ont été associées à une forte augmentation du

risque de développement d'un lupus (>80%)[6]. Cependant, le LES n'est que rarement associé à des anomalies monogéniques et des études sur le génome entier (Genome-Wide Association Studies) ont permis de découvrir plusieurs polymorphismes prédisposant au LES. Ces gènes codent pour des protéines qui interviennent dans différentes composantes du système immunitaire : complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), cellules dendritiques (DC), voie des interférons (IFN), clairance des complexes immuns (CI), signalisation des lymphocytes B (LB) ou T (LT)…[7,8] Les principaux gènes associés au lupus sont indiqués dans le Tableau 1.

Tableau 1 - Principaux gènes associés au lupus (adapté de Rasmussen et al. [9])

	Gène
Gènes du complexe majeur d'histocompatibilité	HLA-DR2 et DR3
	Composants du complément C1q, C4A & B et C2
Gènes impliqués dans la fonction des cellules dendritiques et la voie des interférons de type 1	STAT1, STAT4
	IRAK1, MECP2
	TNFAIP3
	TNIP1
	IRF5
	KIAA1542/PHRF1
Gènes impliqués dans la clairance des complexes immuns et l'immunité innée	FcGR2A-FcGR3A
	FcGR3B
	CRP
	ITGAM-ITGAX
	TREX1*
Gènes impliqués dans la fonction des lymphocytes T et leur signaling	PTPN22
	TNFSF4 (OX40L)
	RASGRP3*
Gènes impliqués dans la fonction des lymphocytes B et leur signaling	BANK1
	PRDM1, ATG5
	IKZF1
	BLK
	LYN
	IL10
	ETS1
Non caractérisés	NMNAT2
	HIC2-UBE2L3
	PXK
	UHRF1BP1
	JAZF1
	XKR6
	LRRC18-WDFY4
	SLC15A4
	PP2CA

1.2.2 Facteurs environnementaux

La photo-exposition solaire est un facteur de risque connu de LES[10] et le caractère photosensible des lésions fait partie des onze critères de classification de l'American College of Rheumatology (ACR) de 1982, révisés en 1997.

Le tabac, via ses actions pro-inflammatoires, est aussi considéré comme un facteur de risque[11]. Dans une étude prospective incluant 64 000 femmes, le risque relatif de développer un lupus est de 1,6 parmi les fumeuses[12], donnée confirmée dans la large méta-analyse de Costenbader *et al*[13]. Le tabagisme actif impacterait également l'histoire de la maladie, avec un risque supérieur de développer des atteintes neurologiques, cutanées et des séreuses[14].

La silice a également été proposée comme un facteur favorisant le lupus[15].

Plusieurs études épidémiologiques ont impliqué les infections dans la genèse du lupus[16,17], et en particulier les virus (parvovirus B19, cytomégalovirus et le virus d'Epstein-Barr (EBV)). L'exposition à l'EBV initierait la maladie via un mimétisme moléculaire. Il a en effet été

montré que la protéine EBNA-1 de l'EBV partage une séquence épitopique commune avec les auto-Ag connus dans le LES, Ro/SSA et Sm notamment[18].

Certains médicaments tels que la procainamide, l'hydralazine, la quinidine, la pénicillamine, l'isoniazide, la méthyldopa, l'acébutolol et des anti-TNF-α comme l'infliximab, ont été décrites comme potentiellement inducteurs de lupus[19]. Les principales drogues inductrices sont répertoriées dans le Tableau 2.

Tableau 2 - Drogues inductrices de lupus et risque associé (d'après Rubin et al. [19])

Agent[a]	Risk[b]
Anti-arrhythmics	
Procainamide (Pronestyl)	High
Quinidine (Quinaglute)	Moderate
Disopyramide (Norpace)	Very low
Propafenone (Rythmol)	Very low
Anti-hypertensives	
Hydralazine (Apresoline)	High
Methyldopa (Aldomet)	Low
Captopril (Capoten)	Low
Acebutolol (Sectral)	Low
Enalapril (Vasotec)	Very low
Clonidine (Catapres)	Very low
Atenolol (Tenormin)	Very low
Labetalol (Normodyne, Trandate)	Very low
Pindolol (Visken)	Very low
Minoxidil (Loniten)	Very low
Prazosin (Minipress)	Very low
Anti-psychotics	
Chlorpromazine (Thorazine)	Low
Phenelzine (Nardil)	Very low
Chlorprothixene (Taractan)	Very low
Lithium carbonate (Eskalith)	Very low
Antibiotics	
Isoniazid (INH)	Low
Minocycline (Minocin)	Low
Nitrofurantoin (Macrodantin)	Very low
Anti-convulsants	
Carbamazepine (Tegretol)	Low
Phenytoin (Dilantin)	Very Low
Trimethadione (Tridone)	Very low
Primidone (Mysoline)	Very low
Ethosuximide (Zarontin)	Very low
Anti-thyroidals	
Propylthiouracil (propyl-thyracil)	Low
Anti-inflammatories	
D-Penicillamine (Cuprimine)	Low
Sulfasalazine (Azulfidine)	Low
Phenylbutazone (Butazolidin)	Very low
Diuretics	
Chlorthalidone (Hygroton)	Very low
Hydrochlorothiazide (Diuchlor H)	Very low
Miscellaneous	
Anti-tumor necrosis-α (Remicade)	Very low
Lovastatin (Mevacor) and other statins	Very low
Levodopa (Dopar)	Very low
Aminoglutethimide (Cytadren)	Very low
Interferon-α (Wellferon) and other cytokines	Very low
Timolol eye drops (Timoptic)	Very low

[a] Commonly used brand names are enclosed in parentheses.
[b] Risk refers to likelihood for lupus-like disease, not autoantibody induction, which is usually much more common.

Le mécanisme le plus fréquemment mis en jeu serait la transformation du médicament en un métabolite réactif par le biais de la myélopéroxydase contenue dans les polynucléaires neutrophiles (PNN). Ces métabolites se fixeraient ensuite à des protéines et les complexes ainsi formés joueraient le rôle d'auto-Ag menant à une rupture de tolérance du soi et donc à un phénomène auto-immun[20].

1.2.3 Mécanismes

1.2.3.1 Apoptose et défaut d'élimination des auto-antigènes

L'apoptose est un phénomène physiologique de mort cellulaire programmée nécessaire à l'homéostasie tissulaire. C'est un phénomène immunologiquement silencieux qui n'entraine physiologiquement pas d'inflammation[21]. Durant l'apoptose, la cellule va subir un compactage et une fragmentation de sa chromatine, conduisant à la production de corps

apoptotiques pouvant se détacher de la cellule en apoptose. Ces corps apoptotiques contiennent de l'ADN, des nucléosomes et d'autres molécules d'origine nucléaire ou non (ARN, protéines, phospholipides) qui pourront constituer une source d'auto-Ag. Il a en effet été montré que la plupart des Ag contre lesquels les patients lupiques développent des anticorps (ADNn, Ro/SSA, La/SSB, RNP, Sm, histones, nucléosomes…) sont retrouvés dans les corps apoptotiques[1].

Il existe de nombreuses modalités d'élimination de ces corps apoptotiques. Notamment, des cellules phagocytaires comme les macrophages ou des éléments humoraux comme le complément ou la protéine C-réactive (CRP). Or ces systèmes peuvent être défectueux chez les patients lupiques. Il a été montré *in vitro* que les phagocytes des patients lupiques digèrent beaucoup moins bien le matériel apoptotique que les phagocytes des sujets sains[22] et *in vivo*, une accumulation de débris de cellules apoptotiques a pu être observée dans des centres germinatifs de patients lupiques[23]. Il y a donc une augmentation de la quantité d'auto-Ag. De plus, les cellules apoptotiques vont entrer dans une nécrose secondaire et former des Secondary Necrotic Cells (SNEC) très pro-inflammatoires relarguant des signaux d'alarmes appelés alarmines comme HMGB1[24]. La présence de ces signaux d'alarme va entrainer l'activation des cellules dendritiques (DC) conventionnelles qui vont capter les auto-Ag des corps apoptotiques insuffisamment éliminés. Ces derniers seront alors présentés via le CMH aux LT.

1.2.3.2 Rôle des lymphocytes T

Les LT sont constitués de différentes populations. On distingue les LT $CD4^+$ auxiliaires (Th1, Th2, Th17, Th21, Treg principalement) identifiés par leur profil de production de cytokines, et les LT $CD8^+$ cytotoxiques, qui peuvent produire de l'INF-γ.

Il a été montré que les LT des patients lupiques sont plus activables du fait, en particulier, d'une hyperactivation du TCR et d'une augmentation de la signalisation intracellulaire[25]. Paradoxalement, ils produisent moins d'IL-2, ce qui peut limiter les mécanismes de mort cellulaire après activation (AICD) ainsi que le développement des LT régulateurs (LTreg) $CD4^+CD25^+FoxP3^+$[26].

Les signaux de costimulation sont également majorés chez les patients lupiques. Il a été montré que lors des poussées, ils expriment davantage le CD40L et le CD40 sur les LT et LB,

respectivement. Le blocage de cet axe permet de diminuer la sévérité des atteintes dans les modèles murins de LES[27].

Les LT $CD4^+$ autoréactifs produisent de l'IFN-γ et de l'IL-6, impliquées dans la prolifération et la différenciation des LB et des plasmocytes. Chez les patients lupiques, on observe aussi une augmentation de leur différenciation en Th17+[28]. Ces derniers sécrètent l'IL-17 qui agit de façon synergique avec BlyS (ou BAFF) pour augmenter la survie des LB[29]. Le rôle des LT est primordial ainsi que le suggère la production d'Ac hypermutés très affins pour les auto-Ag.

1.2.3.3 Rôle des lymphocytes B

Lors de leur maturation dans la moelle osseuse, les mécanismes de recombinaison permettent la génération du répertoire, produisant de manière aléatoire une très grande diversité de BCR (B cell receptor). Des mécanismes de tolérance centrale permettent ensuite d'éliminer, par délétion, les LB en voie de différenciation qui réagissent de manière trop importante avec les Ag du soi (élimination et editing du récepteur avant la sortie). On estime cependant que 10% des LB qui quittent la moelle osseuse en tant que LB transitionnels, sont autoréactifs.[30] Des mécanismes de tolérance périphérique viennent compléter ce processus de sélection. Les LB transitionnels étant encore sensibles à la sélection par apoptose, les LB de forte affinité pour le soi seront éliminés. Ceux de faible affinité deviendront anergiques ou ignorants. Cependant, en de cas de forte stimulation (par les LT, par BlyS, par les TLR), ils peuvent échapper à l'apoptose, entrer dans les centres germinatifs, où ils vont subir une maturation d'affinité par hypermutations somatiques et une commutation isotypique[31].

Chez les patients lupiques de nombreuses protéines régulatrices de l'activation des LB ont une expression diminuée, aussi bien pour la signalisation du BCR que pour l'expression du récepteur inhibiteur FcγRIIb. Ces cellules ont donc un seuil d'activation abaissé[32]. On observe ainsi une diminution du recrutement de Lyn, protéine inhibitrice, permettant une augmentation de la signalisation des voies dépendantes du BCR[33]. Par ailleurs, on note une augmentation d'expression de nombreux signaux de survie et de maturation des LB chez les patients lupiques comme BlyS et l'IL-21, qui agissent de manière synergique pour permettre l'activation, la survie, la prolifération et la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'Ac[34]. Les taux de Blys, protéine produite par les monocytes, les PNN, les LT et les DC, et se fixant sur le récepteur BAFF-R (B cell Activator of the TNF Family Receptor) du LB, seraient corrélés à l'activité de la maladie[35].

Les débris apoptotiques peuvent aussi s'accumuler dans les centres germinatifs où des auto-Ag sont captés par les cellules folliculaires dendritiques qui vont les conserver et ainsi maintenir la stimulation et la survie des LB autoréactifs[23].

1.2.3.4 Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes

Une population particulière de cellules dendritiques dite « plasmacytoïde » (pDC), est principalement impliquée dans la reconnaissance des virus et dans la production d'IFN-α. Elles en produisent plus de 1000 fois plus que tout autre type de cellule[36]. Au cours du LES, les taux d'IFN-α sont corrélés à l'activité de la maladie[37].

Les pDC expriment à leur surface le récepteur FcγRIIa capable de reconnaitre les CI.[37] Ces derniers, une fois endocytés, et selon qu'ils sont constitués d'ARN ou d'ADN, interagissent avec TLR7 ou TLR9 intra-endosomaux, respectivement (Figure 1). Cela provoque l'activation des pDC et leur sécrétion d'IFN-α, qui favorisent notamment la différenciation des LB autoréactifs en plasmocytes producteurs d'auto-Ac[38]. L'IFN-α permet aussi la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire, participant ainsi à la « signature interféron » caractéristique de cette pathologie[39].

Par ailleurs, il a été montré que sous la dépendance du 17-B-estradiol, les pDC sécrètent plus d'IFN-α chez les femmes que chez les hommes[40].

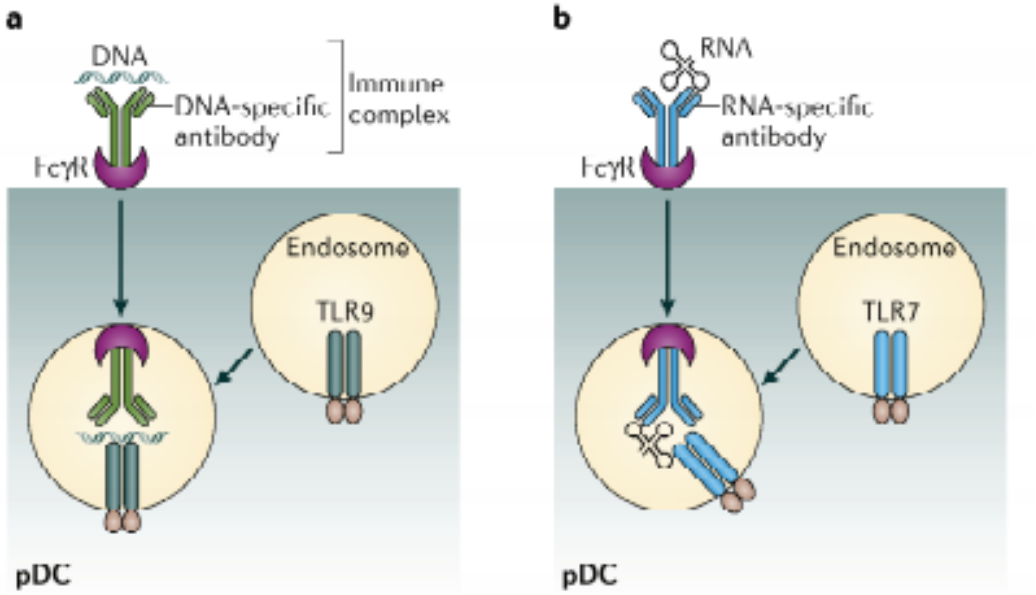


Figure 1 - Internalisation des auto-antigènes et acheminement jusqu'aux TLR endosomaux (d'après Marshak-Rothstein et al.[41])

1.2.3.5 Rôle des polynucléaires neutrophiles

Les PNN sont les cellules effectrices les plus abondantes de l'immunité innée. Elles ont des capacités de phagocytose, de sécrétion de cytokines et produisent des filets de chromatine appelés NET (Neutrophil Extracellular Trap), riches en ADN, en histones et en protéines, qui permettent d'éliminer les microorganismes.

Il a été montré que les PNN sont présents en excès dans la circulation lorsque la maladie lupique est active[42]. Les PNN des patients lupiques ont des capacités de phagocytose altérées[22], et l'accumulation des particules NET va également constituer une source importante d'auto-Ag et de signaux d'alarme dont HMGB1[43]. La clairance des NET est principalement prise en charge par la DNAse I. Chez les patients lupiques, il a été observé une plus faible activité en DNAse I, notamment par production d'Ac anti-DNAse[44] ou par le fait que d'autres auto-Ac peuvent empêcher l'accès de la DNAse I aux NET[45].

Ce défaut de clairance à la fois des SNEC et des NET va faciliter l'exposition des auto-Ag qui vont être reconnus par des Ac circulants et former des CI[46]. Ces derniers sont normalement éliminés par le complément, la CRP, les récepteurs FcγR présents à la surface des phagocytes. Chez les patients lupiques, ces systèmes de clairance sont mis en défaut ou rapidement saturés[46,47]. Les NET accumulés interagissent également avec les pDC, augmentant la production d'IFN-α, notamment via les signaux de dangers qu'ils libèrent[48].

1.2.3.6 Aspects lésionnels

L'apoptose des cellules mésangiales rénales serait une source importante d'auto-Ag, notamment de chromatine et de nucléosomes. Ces derniers possèdent une forte affinité pour la membrane basale glomérulaire et vont alors s'y fixer, on parle « d'Ag plantés ». Les Ac anti-nucléosomes et anti-ADNn circulants peuvent alors s'y lier, activer la voie classique du complément, et initier la réaction inflammatoire par recrutement de cellules phagocytaires (macrophages, PNN). Les dépôts de CI au niveau glomérulaire sont également lésionnels[49].

Les LT $CD8^+$, activés par l'IFN-α, participeraient également aux lésions rénales via une action cytotoxique granzyme dépendante[50].

Les Ac anti-C1q sont capables d'interagir avec le C1q, empêchant l'opsonisation des corps apoptotiques et favorisant les lésions rénales[51].

D’autres auto-Ac peuvent avoir une action lésionnelle directe lorsqu’ils se fixent sur leur cible. C’est le cas des Ac dirigés contre le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) qui jouerait un rôle dans les manifestations neurologiques de la maladie[52], ceux dirigés contre les éléments figurés du sang dans les cytopénies[28], et les Ac anti-Ro/SSA contre les myocytes impliqués dans les cardiopathies foetales[53].

Le Tableau 3 reprend les différents auto-Ac du LES et les principales manifestations cliniques associées.

Tableau 3 – Auto-Ac du LES et manifestations cliniques associées (d'après Rahman et al.[1])

Antigen Specificity	Prevalence†	Main Clinical Effects
	%	
Anti–double-stranded DNA	70–80	Kidney disease, skin disease
Nucleosomes	60–90	Kidney disease, skin disease
Ro	30–40	Skin disease, kidney disease, fetal heart problems
La	15–20	Fetal heart problems
Sm	10–30	Kidney disease
NMDA receptor	33–50	Brain disease
Phospholipids	20–30	Thrombosis, pregnancy loss
α-Actinin	20	Kidney disease
C1q	40–50	Kidney disease

En résumé, plusieurs facteurs participent à la genèse du LES, qu’ils soient environnementaux, génétiques ou immunologiques. Les différentes étapes de la physiopathologie du LES consistent donc :

1) en un défaut de clairance des cellules en apoptose, induisant l'accumulation des corps apoptotiques, première source d'auto-Ag : les SNEC ; les PNN en fournissent une seconde source : les NET ;

2) en une captation par les DC des auto-Ag qui activent les LT autoréactifs ; ces derniers interagissent par l'intermédiaire de cytokines et de signaux de costimulation, et facilitent l'activation des LB, leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'auto-Ac de forte affinité ;

3) en la formation de CI qui initient l'inflammation tissulaire via l'activation du complément, le recrutement des LT CD8+ cytotoxiques et des LT CD4+ auxiliaires sécréteurs de cytokines pro-inflammatoires ;

4) en l'amplification de la réponse auto-immune, via la sécrétion d'IFN-α, cytokine clé de la réaction auto-immune, produite par les pDC et les PNN, et activant de nombreuses cellules immunitaires ; et via des protéines comme BlyS augmentant la survie des LB autoréactifs.

La Figure 2 résume la physiopathologie du LES.

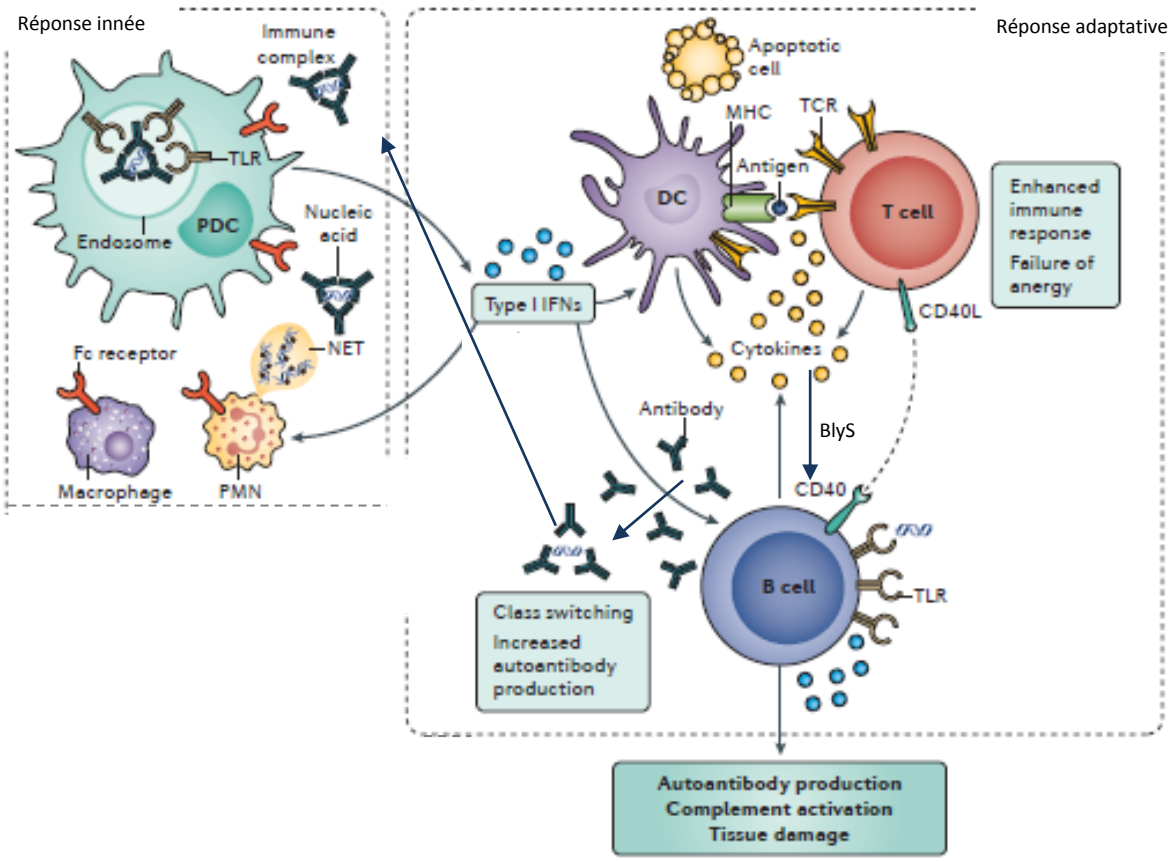


Figure 2 – Physiopathologie du LES (adapté de Kaul et al. [25])

1.3 Aspects cliniques du lupus

Les manifestations cliniques du LES sont très polymorphes. Beaucoup d'organes peuvent être touchés et le pronostic est fonction de la nature des lésions viscérales[54].

Pour chaque patient, l'atteinte clinique et les organes concernés tendent à se préciser au cours des premières années, mais des formes cliniques plus sévères peuvent toujours apparaître, même des années après le diagnostic. L'évolution clinique du LES est très variable selon les patients et peut être marquée par des périodes de rémissions et de rechutes[55].

On distingue schématiquement deux types de tableaux cliniques : des formes bénignes cutanées ou cutanéoarticulaires et des formes sévères avec atteintes viscérales (rénales, cardiaques, neurologiques…). Le diagnostic de LES et sa caractérisation reposent sur un examen clinique approfondi et un bilan biologique adapté.

1.3.1 Manifestations cliniques

Cervera *et al.*[56] ont décrit la fréquence relative des manifestations cliniques du lupus, au diagnostic et au cours de l'évolution de la maladie chez 1000 patients (Tableau 4) suivi durant 10 ans de manière prospective dans 7 pays d'Europe.

Tableau 4 - Fréquence des manifestations cliniques présentes initialement et au cours du LES (adapté de Cervera et al. [56])

Manifestations cliniques	Initialement (%)	Pendant le suivi (%)
Éruption malaire	40,1	57,9
Lupus discoïde	6,3	10,4
Lupus subaigu	2,7	5,6
Photosensibilité	29,4	45,3
Ulcération buccales	10,8	23,8
Polyarthrite	68,9	84,3
Sérite	17,2	36,4
Atteinte rénale	15	39,5
Atteinte neurologique	11,7	26,8
Thrombopénie	9,4	22
Anémie hémolytique	3,8	8,2
Atteinte pulmonaire	2,9	7,3

1.3.1.1 Altération de l'état général

L'altération de l'état général peut se manifester par une anorexie, une asthénie (présente chez 80 à 100% des patients), un amaigrissement (perte de poids supérieure ou égale à 5%), et de la fièvre. Un syndrome dépressif et des troubles du sommeil sont souvent associés[57,58].

1.3.1.2 Manifestations articulaires et osseuses

Les atteintes articulaires sont très fréquentes. Elles inaugurent souvent la maladie, ou se rencontrent lors de son évolution dans plus de 80% des cas. Elles sont caractérisées par un tableau de polyarthralgies ou polyarthrites non destructrices, souvent migratrices, avec atteinte préférentielle du carpe (articulations interphalangiennes proximales et métacarpo-phalangiennes) et des genoux[59]. Moins de 5% des patients développent une arthrite érosive, souvent associée à des Ac anti-CCP (Peptides Cycliques Citrullinés), on parle alors de « rhupus »[60].

L'ostéoporose et l'ostéopénie sont rencontrées chez plus de 20% des patients lupiques. Le risque est plus élevé que dans la population générale du fait de l'activité de la maladie, de la carence en vitamine D, liée à la nécessité de l'éviction solaire, et à l'apparition d'une ménopause précoce, favorisée notamment par l'utilisation chronique de glucocorticoïdes et aux autres traitements cytotoxiques[61–63].

1.3.1.3 Manifestations cutanéomuqueuses

Les lésions dermatologiques inaugurent la maladie dans 25% des cas. Elles peuvent précéder de plusieurs années les atteintes systémiques, et sont le plus souvent localisées dans les zones photo-exposées (visage, décolleté, avant-bras). L'aspect le plus typique est un érythème du visage d'aspect maculeux ou maculo-papuleux, à distribution malaire sur les joues et le nez, en ménageant les plis nasolabiaux : le « vespertilio » ou érythème malaire. Des lésions discoïdes, plus inflammatoires, sont favorisées par l'exposition au soleil. Livedo, urticaire, purpura vasculaire ou alopécie peuvent également être observés. Certains patients peuvent développer des ulcères buccaux et/ou nasaux[59].

1.3.1.4 Manifestations rénales

La survenue d'une néphropathie lupique est un évènement précoce dans l'histoire de la maladie[59,64]. Dans la population caucasienne lupique, elle survient dans 20% des cas. L'atteinte rénale constitue un facteur majeur du pronostic. Elle doit être recherchée

précocement et de façon répétée. La présentation clinique de la néphrite lupique est très variable, allant de l'hématurie et/ou de la protéinurie asymptomatique au syndrome néphrotique et à la glomérulonéphrite à évolution rapide avec perte de la fonction rénale.

Une ponction biopsie rénale est indispensable pour confirmer l'existence d'une néphrite lupique, pour la classer selon l'atteinte histologique d'après la classification de la Société Internationale de Néphrologie et de la Société Rénale d'Anatomopathologie (ISN/RPS) (Tableau 5) de 2003[65], et préciser son étendue. Elle doit être pratiquée en cas de protéinurie persistante supérieure à 500mg/24h[59]. Au moment du diagnostic, selon la classification ISN/RPS, 5 à 10% des patients ont une atteinte de classe II, 10 à 15 % de classe III, 50 à 75% de classe IV, et 10 à 25 % de classe V (également appelée Glomérulonéphrite Extra-membraneuse, ou GEM lupique). Ainsi, une majorité de patients avec atteinte rénale a une néphropathie lupique proliférative (classe III ou IV)[66].

1.3.1.1 Manifestations vasculaires

Le phénomène de Raynaud est un processus vasospastique, induit par le froid ou une émotion, qui survient chez environ 15% des patients atteints de LES. Bien que la plupart des vaisseaux puisse être touchés, l'atteinte des petits vaisseaux est la plus fréquente, se manifestant souvent par des lésions cutanées : purpura, pétéchies, panniculite, hémorragies et ulcérations superficielles[55]. Dans une cohorte de 670 patients atteints de LES, il a été identifié une vascularite chez 11% des patients au cours de la maladie. Les lésions cutanées constituaient le principal tableau clinique de la vascularite puisque présentes chez 89% d'entre eux, les autres présentaient des atteintes viscérales (nerfs périphériques, poumons, pancréas et reins)[67].

1.3.1.2 Manifestations thromboemboliques

Une maladie thromboembolique peut compliquer le LES, en particulier s'il y a un syndrome des anti-phospholipides (SAPL) associé, qui peut affecter les circulations veineuse et/ou artérielle. Dans une cohorte de 554 patients lupiques, nouvellement diagnostiqués, suivis pendant une durée médiane de 6,3 ans, un événement thrombotique artériel est survenu chez 11% des patients, un événement thrombotique veineux chez 5% d'entre eux[68].

Tableau 5 - Classification des néphropathies lupiques ISN/RPS (adapté de Weening et al.[69])

Classe I	**Glomérulonéphrite lupique (GNL) mésangiale minime** Glomérules optiquement normaux, accumulation mésangiale d'immun complexes détectés en IF (immunofluorescence)
Classe II	**GNL mésangiale proliférative** Hypercellularité mésangiale pure avec présence de dépôts immuns mésangiaux en IF. Quelques dépôts isolés sous endothéliaux peuvent être visibles en IF/ME mais pas en MO
Classe III	**GNL focale** Glomérulonéphrite avec prolifération endo ou extracapillaire intéressant < 50% des glomérules, avec dépôts immuns sous endothéliaux, avec ou sans altérations mésangiales.
Classe III (A)	Lésion actives
Classe III (A /C)	Lésions actives et chroniques associées
Classe III (C)	Lésions chroniques inactives avec des glomérules scléreux cicatriciels
Classe IV	**GNL diffuse** Glomérulonéphrite avec prolifération endo ou extracapillaire intéressant ≥ 50% des glomérules avec des dépôts immuns diffus sous endothéliaux avec ou sans altérations mésangiales.
Classe IV (S ou G)	On distingue les atteintes diffuses segmentaires (IV-S) ou globales (IV-G) quand ≥ 50% des glomérules atteints ont respectivement des lésions touchant un segment (S) ou la globalité (G) du floculus glomérulaire.
Classe IV (A)	Lésion actives
Classe IV (A /C)	Lésions actives et chroniques associées
Classe IV (C)	Lésions chroniques inactives avec des glomérules scléreux cicatriciels
Classe V	**GNL extra-membraneuse** Dépôts d'immun complexes sous épithéliaux globaux ou segmentaires. Ce type de GNL peut être associé à une prolifération endo ou extracapillaire, on parle alors d'une combinaison V-III ou V-IV
Classe VI	**GNL scléreuse avancée** Plus de 90% des glomérules sont scléreux

1.3.1.3 Manifestations hématologiques

Les atteintes hématologiques sont fréquentes, et les trois lignées sanguines peuvent être touchées[69]**.** L'anémie, liée à l'inflammation chronique, est la plus fréquente. L'anémie hémolytique auto-immune est relativement rare, mais peut être grave. La leucopénie touche environ 50% des patients. Il s'agit le plus souvent d'une lymphopénie ou, plus rarement, d'une neutropénie. La thrombocytopénie est fréquente, mais rarement profonde (> 50 G/L).

1.3.1.4 Autres manifestations

Les symptômes gastro-intestinaux sont fréquents. Anorexie, nausées et vomissements sont présents chez 50% des patients. Ces effets indésirables sont principalement liés aux traitements, à l'activité de la maladie, ou aux infections[70]**.**

L'atteinte pulmonaire se caractérise le plus souvent par une pleurésie exsudative lymphocytaire, et concerne 35% des patients lupiques[71,72]**.**

La péricardite est la manifestation cardiaque la plus fréquente (25%), mais elle est le plus souvent bénigne et caractérisée par sa grande cortico-sensibilité. D'autres atteintes peuvent être observées telles que la myocardite (rare, mais grave) et l'endocardite de Libman-Sacks, associée à la présence d'Ac anti-phospholipides[73]**.**

Les principales manifestations neurologiques comprennent les céphalées, les convulsions, les dysfonctionnements cognitifs, les psychoses et les dépressions, et les neuropathies périphériques. Elles peuvent être liées à la maladie, mais aussi aux traitements, notamment aux glucocorticoïdes[74]**.**

Toute la structure de l'œil peut être touchée au cours du LES. La kératoconjonctivite sèche en est la manifestation la plus fréquente (jusqu'à 25% des cas). La neuropathie optique, la choroïdopathie, l'épisclérite, la sclérite et l'uvéite antérieure sont moins courantes[75]**.** En outre, il existe des toxicités oculaires spécifiques secondaires aux médicaments, notamment le glaucome induit par les glucocorticoïdes, et une toxicité rétinienne liée aux antipaludéens de synthèse (APS).

1.3.1.5 Cas particulier : le lupus induit

Les lupus induits (LI) ont dans 70% des cas des Ac anti-noyau (AAN) à titre supérieur à 1/160 mais n'ont pas ou très peu d'Ac anti-ADNn, ni d'Ac anti-Ag nucléaires solubles (ENA). Le sex-ratio habituellement observé dans le LES n'est plus respecté, et les atteintes viscérales sont exceptionnelles[76]. La plupart des malades s'améliorent après quelques semaines d'arrêt du traitement en cause. Lorsque les symptômes sont sévères, une corticothérapie brève est indiquée. Les symptômes durent rarement plus que six mois, mais les AAN peuvent persister pendant plusieurs années[77].

1.3.2 Critères de classification

Deux classifications sont aujourd'hui utilisées, la classification ACR publiée en 1982 et mises à jour en 1997[78] (Tableau 6) puis en 2019 (Tableau 7)[79], et la classification SLICC (Tableau 8) (Systemic Lupus International Collaborating Clinics)[80]. Elles permettent l'inclusion des patients dans des études cliniques, mais ne sont pas des critères diagnostiques car leur utilisation peut entrainer un retard diagnostique si trop peu de critères sont présents au début de la maladie, alors que la clinique est évocatrice[81].

1.3.2.1 Critères ACR/EULAR

Pour classer la maladie comme « lupus », quatre des onze critères doivent être présents, soit de manière simultanée, soit de manière successive. Ces critères survalorisent les items dermatologiques contrairement aux critères SLICC.

Tableau 6 - Critères ACR révisés de 1997 (d'après le PNDS [59])

1. Rash malaire
2. Lupus discoïde
3. Photosensibilité
4. Ulcérations orales ou nasopharyngées
5. Arthrites non érosives touchant au moins 2 articulations périphériques, caractérisées par une douleur, un gonflement ou un épanchement
6. Pleurésie ou péricardite
7. Protéinurie persistante > 0,5 g/jour ou cylindrurie
8. Convulsions ou psychose (en l'absence de cause médicamenteuse ou métabolique)
9. Atteinte hématologique :
    - Anémie hémolytique, ou
    - Leucopénie < 4 000/µl constatée à 2 reprises, ou
    - Lymphopénie < 1 500/µl constatée à 2 reprises, ou
    - Thrombopénie < 100 000/µl, en l'absence de drogues cytopéniantes
10. Titre anormal d'Ac antinucléaires par immunofluorescence (en l'absence de drogues inductrices)
11. Perturbations immunologiques :
    - Titre anormal d'Ac anti-ADNn, Ac anti-Sm, ou présence d'Ac APS : sérologie syphilitique dissociée constatée à 2 reprises en 6 mois, ou anticoagulant circulant de type lupique ou titre anormal d'Ac anticardiolipine en IgG ou IgM

La nouvelle classification ACR/EULAR 2019[79] améliore la sensibilité et la spécificité diagnostique, en précisant notamment qu'un taux d'AAN positif à la dilution 1/80 est un préalable à la poursuite des investigations, et en ajoutant la fièvre comme l'un des critères. Les critères cliniques et biologiques sont divisés en domaines et seul le critère ayant le plus de poids dans chaque domaine est pris en considération dans le calcul du score. Un patient ayant un score ≥ 10 peut être classé en LES.

Tableau 7 - Classification ACR/EULAR 2019 (d'après Aringer et al.[79])

Entry criterion

Antinuclear antibodies (ANA) at a titer of ≥1:80 on HEp-2 cells or an equivalent positive test (ever)

↓

If absent, do not classify as SLE
If present, apply additive criteria

↓

Additive criteria

Do not count a criterion if there is a more likely explanation than SLE.
Occurrence of a criterion on at least one occasion is sufficient.
SLE classification requires at least one clinical criterion and ≥10 points.
Criteria need not occur simultaneously.
Within each domain, only the highest weighted criterion is counted toward the total score§.

Clinical domains and criteria	Weight
Constitutional	
Fever	2
Hematologic	
Leukopenia	3
Thrombocytopenia	4
Autoimmune hemolysis	4
Neuropsychiatric	
Delirium	2
Psychosis	3
Seizure	5
Mucocutaneous	
Non-scarring alopecia	2
Oral ulcers	2
Subacute cutaneous OR discoid lupus	4
Acute cutaneous lupus	6
Serosal	
Pleural or pericardial effusion	5
Acute pericarditis	6
Musculoskeletal	
Joint involvement	6
Renal	
Proteinuria >0.5g/24h	4
Renal biopsy Class II or V lupus nephritis	8
Renal biopsy Class III or IV lupus nephritis	10

Immunology domains and criteria	Weight
Antiphospholipid antibodies	
Anti-cardiolipin antibodies OR	
Anti-β2GP1 antibodies OR	
Lupus anticoagulant	2
Complement proteins	
Low C3 OR low C4	3
Low C3 AND low C4	4
SLE-specific antibodies	
Anti-dsDNA antibody* OR	
Anti-Smith antibody	6

**** avec un test ayant une spécificité d'au moins 90%***

Total score:

↓

Classify as Systemic Lupus Erythematosus with a score of 10 or more if entry criterion fulfilled.

1.3.2.2 Critères SLICC

Là encore, quatre critères doivent être présents, dont au moins un critère clinique et un critère biologique ; ou la présence d'une néphrite lupique avec confirmation histologique, associée à des auto-Ac caractéristiques (AAN ou ADNn).

Tableau 8 - Critères SLICC (d'après le PNDS [59])

Critères cliniques

1. Lupus cutané aigu (incluant au moins l'un des critères suivants) :
   - Érythème malaire (ne compte pas si lupus discoïde)
   - Lupus bulleux
   - Nécrolyse toxique épidermique lupique
   - Éruption maculo-papuleuse lupique
   - Éruption lupique photosensible en l'absence de dermatomyosite

OU Lupus cutané subaigu (lésions psoriasiformes ou polycycliques non indurées résolutives sans cicatrices, ou parfois avec une dépigmentation post-inflammatoire ou des télangiectasies)

2. Lupus cutané chronique (incluant au moins l'un des critères suivants) :
   - Lupus discoïde classique
   - Lupus hypertrophique ou verruqueux
   - Panniculite lupique ou lupus cutané profundus
   - Lupus chronique muqueux OU Lupus tumidus OU Lupus engelure
   - Forme frontière lupus discoïde / lichen plan

3. Ulcères buccaux : palatins (bouche, langue) OU Ulcérations nasales en l'absence d'autre cause telle que vascularite, maladie de Behcet, infection (herpès virus), maladie inflammatoire chronique intestinale, arthrite réactionnelle et acides

4. Alopécie non cicatricielle (éclaircissement diffus de la chevelure ou fragilité capillaire avec mise en évidence de cheveux cassés) en l'absence d'autres causes comme une pelade, des médicaments, une carence martiale et une alopécie androgénique

5.Synovite de plus de deux articulations, caractérisée par un gonflement ou un épanchement
OU Arthralgies de plus de 2 articulations avec dérouillage matinal de plus de 30 minutes

6. Sérites :
   - Pleurésie typique > 24 h ou Épanchement pleural ou Frottement pleural
   - Douleur péricardique typique (aggravée par le décubitus et améliorée en antéflexion) > 24 h
     - OU Épanchement péricardique OU Frottement péricardique
     - OU Signes électriques de péricardite en l'absence d'autre cause telle qu'une infection, une insuffisance rénale ou un syndrome de Dressler

7. Atteinte rénale : Rapport protéinurie / créatinine urinaire (ou protéinurie des 24 h) représentant une protéinurie > 500 mg/24 h (la bandelette urinaire est supprimée) OU Cylindres hématiques

8. Atteinte neurologique
   - Convulsions OU Psychose
   - Mononévrite multiple en l'absence d'autre cause connue comme une vascularite primitive
   - Myélite OU Neuropathie périphérique ou atteinte des paires crâniennes en l'absence d'autre cause connue comme une vascularite primitive, infection et diabète
   - Syndrome confusionnel aigu en l'absence d'autres causes (toxique, métabolique, urémique, médicamenteuse…)

9. Anémie hémolytique

10. Leucopénie (< 4 000/mm3, un épisode suffit) en l'absence d'autre cause connue (syndrome de Felty, médicaments, hypertension portale…)
OU Lymphopénie (< 1 000/mm3, un épisode suffit) en l'absence d'autre cause (corticothérapie, médicaments, infections…)

11. Thrombopénie (< 100 000/mm3 un épisode suffit) en l'absence d'autre cause (médicaments, hypertension portale, PTT…)

Critères immunologiques

1. Titre d'Ac antinucléaires supérieurs à la norme du laboratoire
2. Ac anti-ADNn supérieurs à la valeur de référence du laboratoire (> 2 fois valeur de référence si test ELISA)
3. Présence d'un Ac dirigé contre l'Ag Sm
4. Ac antiphospholipides positifs déterminés par :
   - Présence d'un anticoagulant circulant
   - Ac anticardiolipine (IgA, IgG, or IgM) OU Ac anti- ß2-glycoprotéine1 (IgA, IgG, or IgM)
5. Diminution du complément : C3 bas OU C4 bas OU CH50 bas
6. Test de Coombs direct positif (en l'absence d'anémie hémolytique)

1.3.2.3 Comparaison des performances

Les nouveaux critères de classification ACR/EULAR 2019 ont les meilleures performances. Ils ont l'avantage d'avoir une sensibilité proche des critères SLICC 2012 tout en conservant la spécificité des critères ACR 1997. Le Tableau 9 compare les performances des différents critères de classification.

Tableau 9 - Performances des critères de classification de LES (d'après Aringer et al.[79])

Critères	ACR 1997	ACR/EULAR 2019	SLICC 2012
Sensibilité	82.8%	96.1%	96.7%
Spécificité	93.4%	93.4%	83.7%

1.4 Paramètres biologiques du lupus : les auto-anticorps

1.4.1 Anticorps anti-noyau

Les AAN sont des auto-Ac dirigés contre les structures du noyau, acides nucléiques ou protéines. Ils peuvent être détectés à taux faible chez un sujet sain, c'est pourquoi leur recherche doit être guidée par un contexte clinique clair et leur exploration doit tenir compte du seuil de positivité retenu, habituellement de 160, même si un titre supérieur à 80 est significatif dans les recommandations récentes[59,79]. Ils sont recherchés par immunofluorescence indirecte (IFI) sur une lignée cellulaire humaine de carcinome laryngé, dite « HEp2 » (Human Epithelial cell line type 2). Il s'agit d'un test de dépistage qui, s'il est positif, doit donner lieu à la description de l'aspect de la fluorescence observée, à un titrage et à leur caractérisation. La Figure 3 représente le principe de l'IFI sur lame.

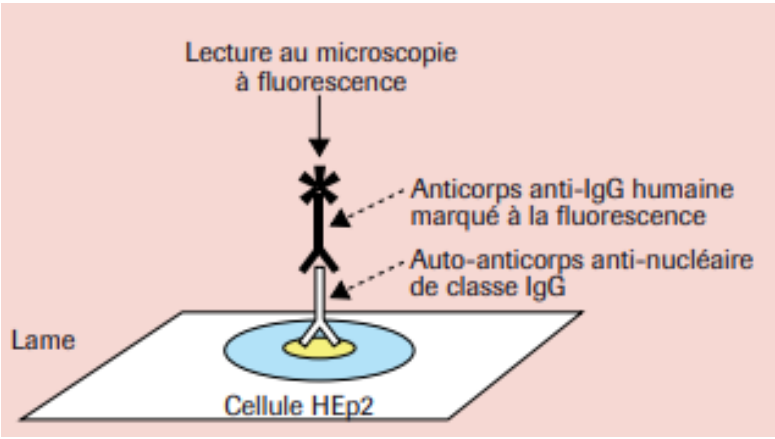


Figure 3 - Principe de IFI (d'après cri-net.com [82])

La fluorescence peut être homogène, mouchetée, nucléolée, en grains (dots), cytoplasmique ou combiner plusieurs de ces aspects. Lors du LES, la plus fréquemment observée est une fluorescence forte et homogène du noyau, avec marquage de la chromatine des cellules en division. En dehors de cet aspect caractéristique, l'interprétation est difficile et peut varier en fonction des préparations de réactifs (fabricant, lots), et évoluer chez un patient au cours du temps et selon le traitement.

La recherche des AAN par IFI a une très bonne valeur prédictive négative (VPN) dans le diagnostic de lupus. En effet, moins de 0,8% des patients présentant des Ac anti-ADNn ne posséderaient pas d'AAN[83]. La Figure 4 représente l'aspect de fluorescence homogène couramment rencontré dans le LES.

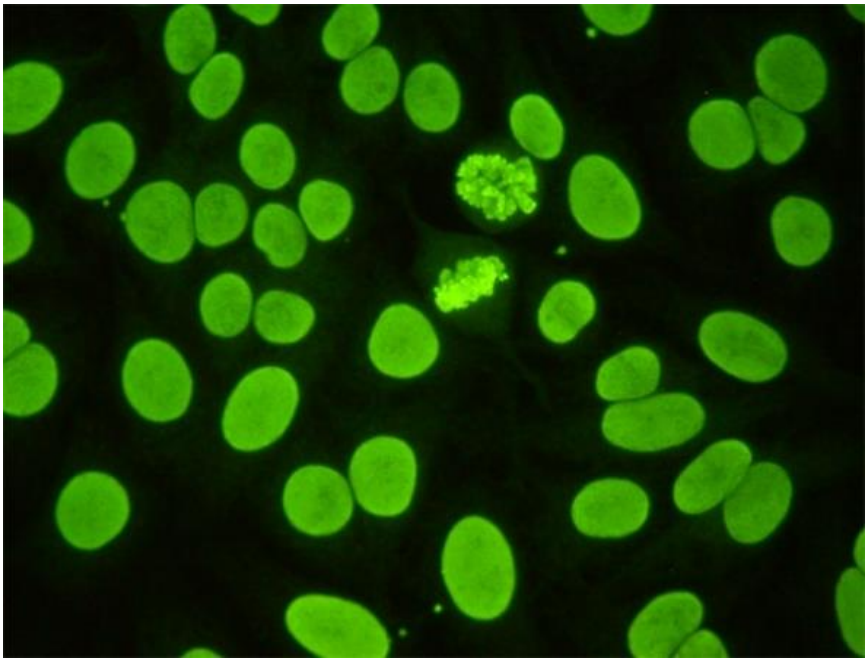


Figure 4 - Fluorescence homogène observée en IFI au cours du lupus (source http://www.geai-lesautoAc.fr/50-Ac-antinucleacute-aires)

1.4.2 Anticorps anti-ADN natif

1.4.2.1 Historique

C'est au milieu du XXe siècle que Haserick a montré que le sérum des patients lupiques, mis en présence d'une moelle osseuse normale, provoquait la formation d'une cellule dite « cellule LE » ou « cellule de Hargraves ». Il s'agit d'un PNN ayant phagocyté le noyau préalablement altéré de n'importe quelle autre cellule. Cette cellule LE renferme une grosse inclusion basophile pâle et possède un noyau périphérique altéré. Elle avait été identifiée initialement par Hargraves dans le sang et la moelle des malades atteints de LES. La

formation des cellules LE est due à la présence dans le sang des malades d'auto-Ac qui reconnaissent les noyaux cellulaires : les Ac anti-ADNn.

Il faudra attendre les années 1970, pour que la généralisation de l'immunofluorescence sur différents substrats (*Crithidia luciliae*, coupes de tissus/foie de rat) devienne la technique de référence pour le dépistage du LES[84]. La Figure 5 représence l'évolution des techniques de recherche des Ac anti-ADNn.

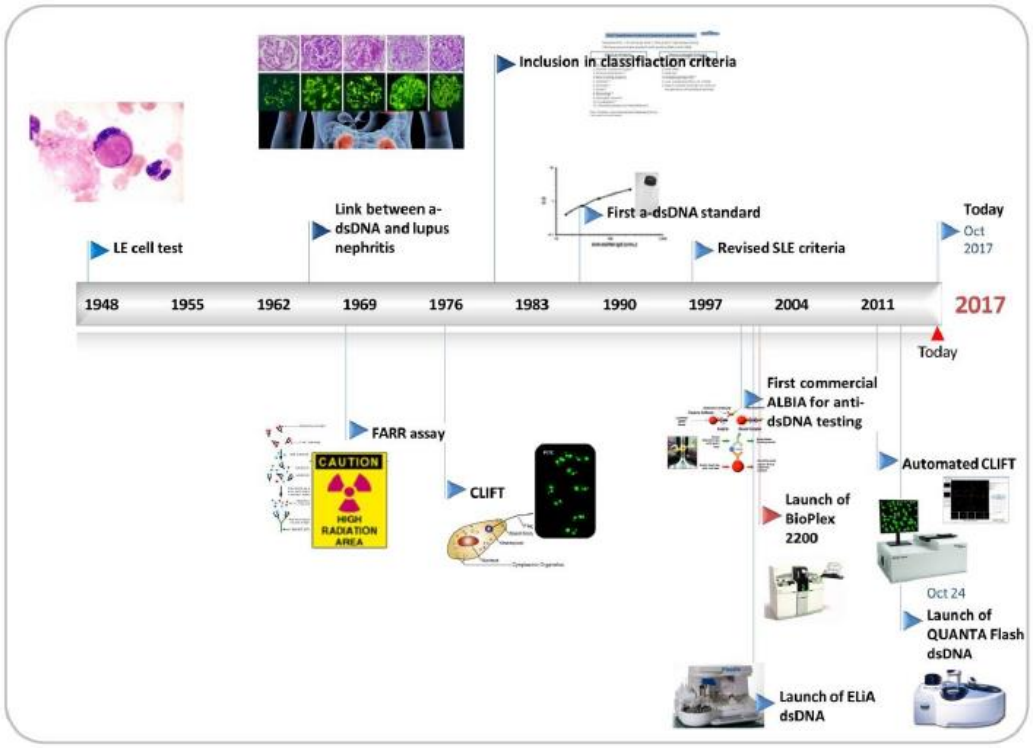


Figure 5 - Histoire des Ac anti-ADNn (issu de Mummert et al.[85])

Ces Ac dirigés contre l'ADNn ou « double brin » reconnaissent des oligonucléotides présents uniquement lorsque la double hélice de l'ADN est fermée, notamment au niveau des liaisons entres bases complémentaires. Le paratope reconnait des régions constituées d'environ 6 nucléotides. Ils doivent être différenciés des Ac dirigés contre l'ADN dénaturé ou « simple brin » (ADNd) qui reconnaissent des régions nucléotidiques (bases puriques ou pyrimidiques) n'apparaissant que lorsque la double hélice est dénaturée ou partiellement ouverte[86]. Ces derniers sont également fortement augmentés au cours du LES, mais ne sont pas spécifiques. Seuls les IgG anti-ADNn ont une valeur diagnostique dans le LES[85].

1.4.2.2 Evolution des pratiques

Mummert *et al.*[85] ont évalué l'évolution des techniques de dosage des Ac anti-ADNn entre 2009 et 2017, sur la base des résultats fournis par l'organisme d'évaluation externe de la qualité UKNEQAS (Figure 6). Bien que les pratiques ne soient pas les mêmes selon les pays, la tendance actuelle est la diminution de l'utilisation des techniques de précipitation utilisant des traceurs radioactifs (test de Farr) ou utilisant des ELISA en microplaques, alors qu'on observe une nette augmentation de l'utilisation des techniques automatisées, notamment des automates de chimiluminescence (CLIA).

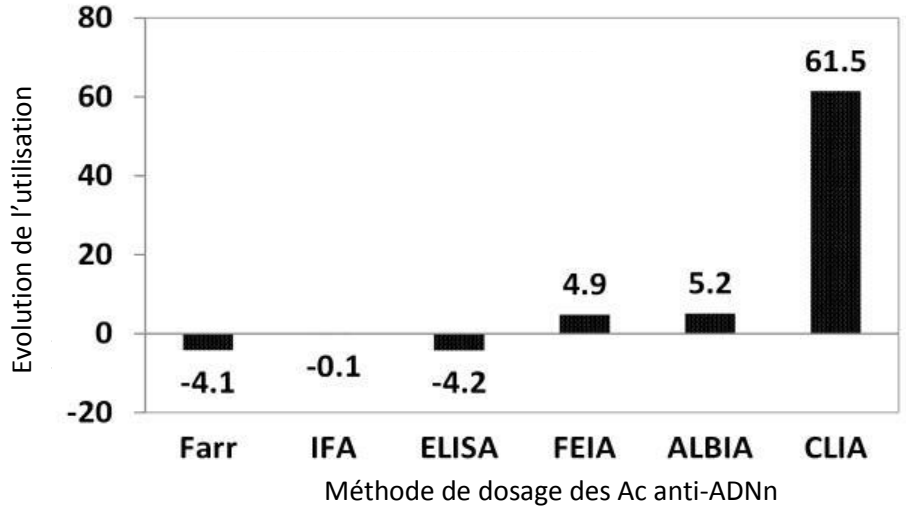


Figure 6 - Evolution (en pourcentage) de l'utilisation des techniques de dosages des anti-ADNn entre 2009 et 2017 (données UKNEQAS) (adapté de Mummert et al.[85])

Farr ; IFA : immunofluorescence (type Crithidia) ; ELISA : dosage immunoenzymatique ; FEIA : dosage immunofluoroenzymatique automatisé (type Elia Phadia) ; ALBIA : cytométrie de flux (type Luminex) ; CLIA : chimiluminescence (type Bioflash, iSYS)

1.4.2.3 Intérêt du dosage

Il a été montré dès 1971 qu'il existait une corrélation entre l'activité du lupus et le taux d'Ac anti-ADNn[87]. Ils sont présents au moment des poussées, et ils ont aussi un intérêt prouvé dans le suivi des patients[88]. Le suivi de leur taux, en combinaison avec celui des Ac anti-C1q, serait un bon marqueur de néphrite lupique[89]. De la même manière, l'efficacité des traitements est associée à la baisse des Ac anti-ADNn. Une revue de la littérature récemment effectuée par Bragazzi *et al.* a présenté les principales études décrivant l'impact des traitements immunosuppresseurs sur le taux d'Ac anti-ADNn[90]. La plupart d'entre elles concluaient à une baisse du taux d'Ac après introduction du traitement. Monzavi *et al.* ont également montré que l'hydroxychloroquine (HCQ), après deux mois de traitement, s'accompagne d'une diminution de l'activité de la maladie, d'une diminution du taux d'Ac anti-ADNn, de la

restauration de l'activité du complément (CH50), et de la diminution des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF-α)[91].

1.4.2.4 Méthodes de dosage des IgG anti-ADNn

- ✓ **Méthode de référence : le test de Farr**

Le sérum du patient est incubé avec de l'ADN double brin marqué avec un radio-isotope (l'Iode 125). Les Ac anti-ADNn du sérum se fixent à l'ADN double brin en excès. Après précipitation et centrifugation, la radioactivité mesurée dans le culot contenant les complexes immuns est proportionnelle au taux d'Ac anti-ADNn. Cette technique est sensible et très spécifique. Elle permet la détection des Ac de haute affinité, mais nécessite que le laboratoire soit agréé en radioimmunoanalyse. Du fait de ces contraintes, elle est aujourd'hui de moins en moins utilisée, mais reste un recours dans des cas particuliers de forte suspicion de LES (lorsque que les autres techniques sont négatives), ou de suspicion de résultats faussement positifs. Elle peut également être intéressante chez l'enfant au début de la maladie car elle détecte aussi les IgM anti-ADNn, alors que les tests ELISA ou les techniques automatisées ne détectent que les IgG[92]. Le principe de dosage est résumé sur la Figure 7.

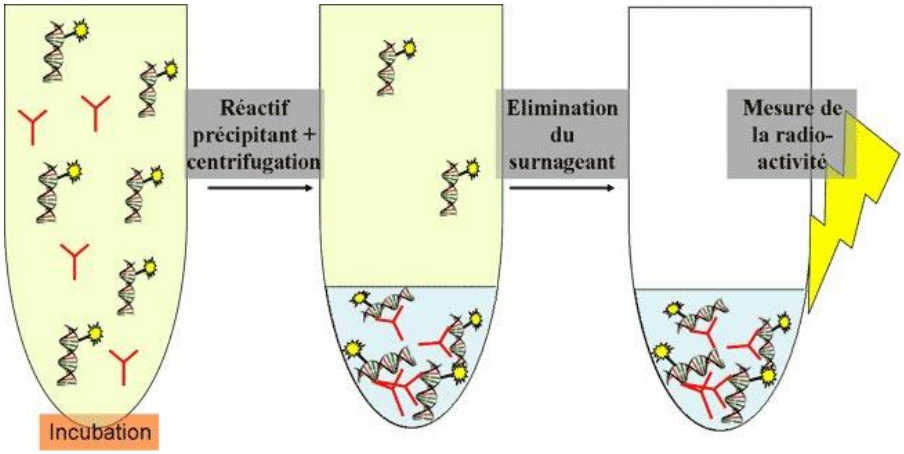


Figure 7 - Test de Farr (d'après memobio.fr)

- ✓ **Immunofluorescence sur *Crithidia luciliae* (CLIFT)**

Crithidia luciliae est un protozoaire hémoflagellé proche des trypanosomes qui possède un kinétoplaste (organite situé près de la base du flagelle) riche en ADN double brin circulaire.

Cette technique a été développée en 1975 par l'équipe d'Aarden[94]. Son principe repose la fixation des Ac anti-ADNn du sérum sur le kinétoplaste du protozoaire révélé par immunofluorescence. L'interprétation du test (Figure 8) dépend de la préparation des lames

de *Crithidia*, du stade de leur culture au moment de leur fixation sur les lames et de l'expérience du lecteur.

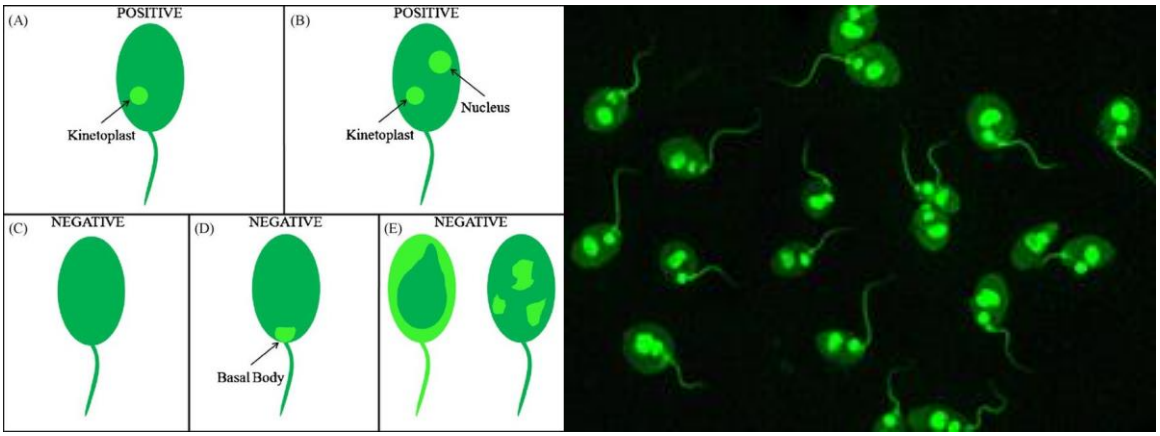


Figure 8 - Interprétation de lecture en IFI des anti-ADNn sur Crithidia luciliae (d'après Soda et al.[93] et illustration issue de www.euroimmun.com)

Par ailleurs, cette technique a une faible sensibilité, estimée entre 8,2 et 55% selon les études, mais dans des conditions optimales, sa spécificité serait proche de 90%[95–97]. Cette technique est semi-quantitative et son intérêt réside en sa capacité à confirmer un résultat douteux obtenu par une autre technique[97].

- ✓ **Immunodosages sur supports solides**

Les auto-Ac sont très largement recherchés par immunodosage. Il en existe plusieurs, avec des modes de révélation différents, mais le principe reste le même : fixer l'auto-Ac spécifique sur l'Ag d'intérêt, lui-même étant présenté sur une phase solide (microplaque, microbille…), puis révéler la présence de cet Ac à l'aide d'un antisérum anti-immunoglobulines humaines, marqué par une enzyme avec réaction colorimétrique (ELISA) ou réaction de fluorescence (ELIA), un fluorochrome (ALBIA) ou une molécule organique luminescente (CLIA). La Figure 9 résume le principe d'un immunodosage.

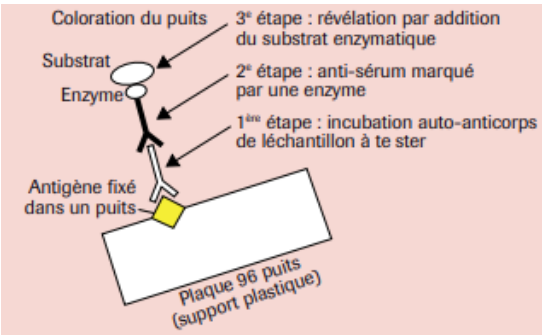


Figure 9 - Principe d'un immunodosage sur support solide (d'après cri-net.com [82])

1.4.3 Autres auto-anticorps retrouvés dans le lupus

1.4.3.1 Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

Les Ac anti-Sm (Smith) sont dirigés contre un complexe ribonucléoprotéique nucléaire. Très spécifiques du LES, ils sont cependant très peu sensibles puisque présents dans seulement 30% des cas. Ils seraient prédictifs d'une atteinte rénale[98,99].

Les Ac anti-RNP (Ribonucléoprotéine) ne sont retrouvés que dans 25% des cas et ne sont pas spécifiques. Ce sont principalement des marqueurs de connectivites mixtes (MCTD). Elles associent des signes cliniques de diverses connectivites (LES, sclérodermies, polyarthrites, myosites auto-immunes) à des taux élevés d'Ac anti-RNP.

Les Ac anti-Ro/SSA et anti-La/SSB sont également peu sensibles (30% et 15% respectivement) et peu spécifiques. Ils sont associés au syndrome de Sjögren, dans 60% et 50%, respectivement. Les Ac anti-Ro/SSA sont également présents dans 10% des polyarthrites rhumatoïdes. Cependant, il a été montré que les Ac spécifiques anti-SSA-60kDa seraient 3.5 fois plus associés à la survenue d'un LES comparativement à d'autres maladies systémiques[100].

Les Ac anti-nucléosomes ont été décrits comme étant les plus fréquemment retrouvés chez les patients lupiques (60 à 90%). Tout comme les anti-ADNn, ils prédiraient la survenue d'une poussée lupique et d'une atteinte rénale, mais ils sont peu spécifiques, car présents également dans certaines sclérodermies, MCTD et hépatites auto-immunes de type 1[101].

Les Ac anti-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) sont dirigés contre une protéine de 34 kDa auxiliaire de la polymérase δ, impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN, dont l'expression dans la cellule varie selon le cycle cellulaire. Ils peuvent être associés au lupus même s'ils sont rares (prévalence < 5%). La fluorescence sur cellules Hep2 est fortement évocatrice de leur présence[102].

1.4.3.2 Anticorps anti-C1q

Les Ac anti-C1q sont produits par 30 à 50% des patients lupiques. Bien que non spécifiques de la maladie (puisque également retrouvés dans la vascularite urticarienne hypocomplémentémique), il existe une corrélation entre le taux d'Ac anti-C1q et l'activité de la néphrite lupique.[103]

1.4.3.3 Anticorps anti-phospholipides

Les Ac anti-cardiolipine (IgG et IgM), anti-B2GP1 (IgG et IgM) et les anti-coagulants circulants de type lupique doivent être recherchés lors du bilan initial car ils sont fréquents au cours du LES, même en l'absence de toute manifestation thrombotique artérielle ou veineuse et/ou obstétricale. Leur présence doit être confirmée sur un second sérum à 12 semaines d'intervalle[59].

1.4.4 Autres marqueurs biologiques du lupus

1.4.4.1 Marqueurs hématologiques

La surveillance de la numération formule sanguine permet de rechercher une cytopénie, notamment une lymphopénie ou une thrombopénie.

1.4.4.2 Marqueurs inflammatoires

Les patients lupiques présente souvent dissociation entre la vitesse de sédimentation (VS) et la CRP. Plusieurs mécanismes ont été décrits, notamment la plus grande fréquence des Ac anti-CRP dans la population lupique, mais surtout la présence d'une augmentation polyclonale des immunoglobulines sériques qui est l'une des principales causes d'augmentation non inflammatoire de la VS[104]. Une étude menée par Littlejohn *et al.* a montré que l'utilisation du ratio VS/CRP chez les patients lupiques permettait de distinguer une infection (ratio < 2) d'une poussée de la maladie (ratio > 15)[105].

1.4.4.3 Système du complément

C'est la première ligne de défense contre les microorganismes et il joue également un rôle crucial dans l'élimination des CI circulants. Hors des déficits constitutionnels cités plus haut, les poussées lupiques sont marquées par une activation aiguë de la voie classique du complément qui entraine une consommation des fractions C3 et C4, et une forte diminution du CH50[103]. De ce fait, lors des poussées lupiques, l'organisme est davantage susceptible aux infections, et ce phénomène est amplifié par les traitements.

1.4.4.4 Marqueurs de dysfonction rénale

La recherche d'une protéinurie par bandelette urinaire est effectuée lors des consultations de suivi des patients. En cas positivité, une mesure de la protéinurie des 24h ou du rapport protéinurie/créatininurie sur échantillon urinaire doit être réalisée. Pour rappel, la protéinurie

physiologique est inférieure à 150mg/24h. La créatininémie et le calcul du débit de filtration glomérulaire sont également déterminés, car ce sont de bons indicateurs de la fonction rénale.

Au total, les recommandations de la Ligue Européenne contre les Rhumatismes (EULAR) préconisent le suivi biologique de ces marqueurs, afin de dépister précocement une poussée lupique et une atteinte organique.[106]

1.5 Traitements du LES

1.5.1 Approche pharmacologique

L'adhésion du patient au traitement de sa maladie est un objectif essentiel. Il y a peu de moyen d'évaluer l'observance outre le dosage des médicaments à demi-vie longue tel que l'HCQ.[107] Le choix du traitement prend en compte plusieurs paramètres, notamment l'activité de la maladie (symptômes prédominants, organes atteints…), la réponse à un traitement antérieur, les effets indésirables potentiels… Compte tenu de l'hétérogénéité clinique et de l'évolution quelques fois imprévisible de la maladie, l'approche thérapeutique peut être variable, mais est généralement guidée par les manifestations prédominantes.

1.5.1.1 Les antipaludéens de synthèse

Les antipaludéens de synthèse (APS) appartiennent à la famille des amino-4-quinoléines est principalement constituée de deux médicaments qui sont l'HCQ et la chloroquine. En général, le premier est préféré en raison d'une moindre toxicité rétinienne et cardiaque. Il constitue l'un des principaux traitements de fond du LES. Ses mécanismes d'action seraient multiples (Figure 10). En effet, en s'accumulant dans les lysosomes et les phagosomes des cellules phagocytaires, il provoque une augmentation du pH endosomal qui aurait pour effet d'inhiber l'expression du CMH de classe II, diminuant ainsi la présentation des auto-Ag aux LT et la production des cytokines pro-inflammatoires par les cellules T et B. D'autre part, en inhibant la fixation des acides nucléiques sur les TLR 7 et 9 endosomaux, il diminuerait l'activation des pDC et la sécrétion d'IFN-α. Il réduirait ainsi la signature interféron des patients lupiques[108].

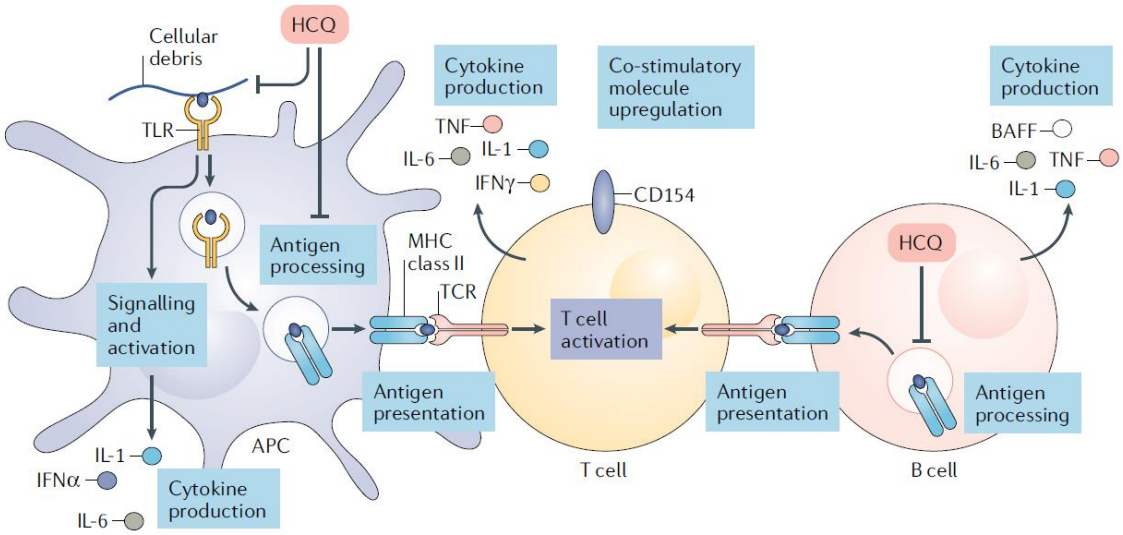


Figure 10 - Mécanisme d'action de l'HCQ (d'après Schrezenmeier et al. [108])

Les avantages majeurs des APS incluent le soulagement des manifestations musculo-squelettiques et cutanéo-muqueuses. Ses effets de prévention de la survenue de nouvelles poussées, de diminution du nombre d'évènements thrombotiques, du nombre de lésions organiques et d'amélioration de la survie, sont clairement établis[109,110]. L'HCQ, commercialisée sous le nom de Plaquenil®, est généralement prescrit au long cours à la dose de 400 mg/j, en l'absence d'insuffisance rénale et hépatique. Un antécédent de rétinopathie demeure la seule contre-indication absolue pour les patients lupiques adultes et une surveillance ophtalmologique est indispensable[111].

1.5.1.2 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Ils sont principalement indiqués dans la prise en charge des manifestations cutanéo-articulaires. Il faut noter toutefois que l'ibuprofène est contre-indiqué chez les patients lupiques en raison du risque de méningite aseptique[59].

1.5.1.3 Les corticoïdes

Les manifestations cutanéo-articulaires peuvent être soulagées par l'administration de faibles doses de corticoïdes (≤ 7,5 mg d'équivalent de prednisone par jour). Dans les formes graves, la dose initiale peut être élevée allant jusqu'à 1 mg/kg/jour pour le traitement des néphrite lupique proliférative, des atteintes neurologiques diffuses, ou des thrombopénies ou hémolyses sévères, et de 0,5 mg/kg/jr dans les sérites. Des bolus de méthylprednisolone peuvent précéder la corticorthérapie orale dans les formes sévères, à la dose de 1 g, trois jours consécutifs[59].

L’un des principaux avantages de la corticothérapie est qu’elle réduit rapidement l’inflammation, contribuant ainsi à la maîtrise de la maladie. Cependant, il faut toujours tenter d’en minimiser l'exposition, compte tenu de ses effets néfastes à long terme (effets métaboliques, asthénie, ostéoporose, nécrose avasculaire des hanches et des genoux…). Les patients vivant plus longtemps avec leur maladie, il en résulte une forte augmentation de leur exposition totale aux corticoïdes[112]. Tout sevrage doit être précédé d’une exploration de l’axe hypothalamo-hypophyso-surrénal, pour ne pas risquer l’insuffisance surrénalienne aigüe.

1.5.1.4 Les immunosuppresseurs

Les objectifs du recours aux immunosuppresseurs sont multiples : améliorer la maîtrise de la maladie dans les formes où la corticorésistance est avérée, permettre une épargne cortisonique, et diminuer le risque de rechute. Les risques potentiels des immunosuppresseurs, notamment infectieux, en font limiter l’utilisation aux formes cliniques pouvant mettre en jeu le pronostic vital.

En cas de poussée aiguë, il est généralement nécessaire d’instaurer une immunosuppression intensive par un traitement d’induction, suivi d’un traitement d'entretien, plus long et idéalement moins toxique, destiné à consolider la rémission et à prévenir les poussées.

Le cyclophosphamide a été pendant longtemps l’immunosuppresseur de référence pour les néphrite lupique proliférative, mais en raison de son risque oncogène important (cancer de la vessie et myélodysplasie, notamment), il a progressivement été remplacé par l’azathioprine et le mycophénolate mophetil.

Le rituximab est un Ac monoclonal anti-CD20 chimérique appauvrissant le pool circulant de LB. Plusieurs études ont démontré son efficacité dans la prise en charge de patients lupiques, avec ou sans néphrite lupique, n'ayant pas répondu au traitement standard[113,114].

D’autres médicaments plus récemment développés, comme le belimumab, sont réservés aux patients atteints d’un LES (hors atteintes rénales et cérébrales) résistant aux autres traitements. Il s’agit d’un Ac monoclonal humain qui inhibe la forme soluble du facteur de survie Blys des LB[115].

1.5.2 Prophylaxie - Règles hygiéno-diététiques

1.5.2.1 Vaccination

L'immunisation contre les pathogènes courants est une nécessité avant la mise en place des traitements immunosuppresseurs. Le vaccin antigrippal antipneumococciques induisent chez ces patients des titres d'Ac vaccinaux inférieurs à ceux de la population générale, mais sont tout de même protecteurs vis-à-vis des infections, et sont donc recommandés[116]. Le vaccin quadrivalent contre le papillomavirus humain s'est révélé efficace chez les patientes atteintes de LES stable, sans augmentation de l'activité de la maladie ni de poussées[117]. Il a également été montré que le vaccin anti-hépatite B était sans danger chez ces patients[118]. Au total, les vaccins recommandés dans la population générale le sont également chez les patients lupiques, sauf les vaccins vivants atténués qui sont proscrits en cas de traitement par immunosuppresseur[59].

1.5.2.2 Protection solaire

L'exposition aux rayons ultraviolets peut exacerber ou induire les manifestations du LES. Les patients doivent donc éviter toute exposition à la lumière directe ou réfléchie du soleil, ainsi qu'à d'autres sources de rayons ultraviolets, et les médicaments photosensibilisants doivent également être évités[119]. En effet, les rayons ultraviolets favorisent l'apoptose des kératinocytes et la production en excès de corps apoptotiques[28]. Du fait de cette éviction solaire, ils doivent être supplémentés en vitamine D. Il a aussi été montré que cette supplémentation était corrélée à une plus faible activité de la maladie, et à des taux d'Ac anti-ADNn et d'IFN-α plus bas probablement en raison de son rôle immunomodulateur[120].

1.5.2.3 Tabac

Le tabagisme actif est associé à une maladie plus active[121], sans compter le risque accru d'athérosclérose associé à la survenue de maladies coronariennes plus fréquentes chez les patients lupiques[122]. Il existe également des éléments suggérant que le tabagisme diminue l'efficacité de l'HCQ[123].

1.5.2.4 Contraception

La contraception orale a longtemps été déconseillée chez les patientes lupiques, notamment suite à l'apparition de poussées de la maladie après l'introduction de la pilule oestroprogestative. Les recommandations n'ont pas été modifiées, et la Haute Autorité de

Santé contre-indique les oestroprogestatifs chez les patientes ayant une maladie lupique active, ou présentant un SAPL[124].

1.5.2.5 Lupus et grossesse

La grossesse doit être au maximum évitée durant les phases actives de la maladie, en particulier en cas d'atteinte viscérale grave, en raison d'un risque élevé de fausse couche et d'exacerbation du LES. Pour envisager une grossesse sereinement, il est recommandé que la maladie soit quiescente depuis au moins six mois[59]**.** Il faut également prendre en compte la tératogénicité de certains traitements : cyclophosphamide, méthotrexate, mycophénolate mofétil, thalidomide…

1.6 Evolutivité de la maladie et pronostic

Le caractère fluctuant de l'évolution du LES a imposé le développement d'outils permettant de mesurer l'activité de la maladie. Le plus couramment utilisé étant le SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Activity Index) dont les items sont indiqués dans le Tableau 10. Il attribue un score selon les paramètres clinico-biologiques, parmi 24, présents dans les dix jours précédant la consultation. Les items sont intégrés de manière binaire (présence/absence) et le score final permet d'évaluer le niveau d'activité du lupus. Une amélioration des symptômes est actée lorsque le score diminue d'au moins quatre points par rapport à la précédente évaluation.

Le SLEDAI a subi de nombreuses modifications au cours du temps. Le SELENA-SLEDAI en est une version modifiée, mais les systèmes/organes, et les scores pondérés sont les mêmes que pour le SLEDAI. Le SLEDAI-2K a, quant à lui, l'avantage de prendre en compte l'ensemble des symptômes présents au moment de la visite, là où le SLEDAI ne tenait compte que des symptômes nouveaux ou aggravés. Le niveau d'activité du LES selon le score du SLEDAI est représenté dans le Tableau 11.

Tableau 10 - Score SLEDAI (d'après Secor R [125])

Score	Manifestations	Définition
8	Convulsion	Apparition récente. Exclusion des causes métaboliques, infectieuses ou médicamenteuses.
8	Psychose	Perturbation de l'activité normale en rapport avec une altération sévère de la perception de la réalité. Comprend : hallucinations, incohérence, appauvrissement du contenu de la pensée, raisonnement illogique, comportement bizarre, désorganisé ou catatonique. Exclusion d'une insuffisance rénale ou d'une cause médicamenteuse.
8	Atteinte cérébrale	Altération des fonctions mentales avec troubles de l'orientation, de la mémoire ou autre, d'apparition brutale et d'évolution fluctuante. Comprend : troubles de la conscience avec réduction des capacités de concentration, incapacité à rester attentif avec en plus 2 au moins des manifestations suivantes : troubles perceptifs, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice.
8	Troubles visuels	Atteinte rétinienne du lupus. Comprend : nodules dysoriques, hémorragies rétiniennes, exsudats séreux ou hémorragies choroïdiennes, névrite optique. Exclusion d'une cause hypertensive, infectieuse ou médicamenteuse.
8	Nerfs crâniens	Neuropathie sensitive ou motrice d'apparition récente touchant un nerf crânien.
8	Céphalées	Céphalées sévères et persistantes, pouvant être migraineuses mais résistant aux antalgiques majeurs.
8	AVC	Accident vasculaire cérébral d'apparition récente. Artériosclérose exclue.
8	Vascularite	Ulcérations, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus périunguéaux ou preuve histologique ou artériographie de vascularite.
4	Arthrites	Plus de 2 articulations douloureuses avec des signes inflammatoires locaux (douleur, tuméfaction ou épanchement articulaire).
4	Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale associée à une élévation des CPK et/ou aldolases ou à des modifications électromyographiques ou à une biopsie montrant des signes de vascularite.
4	Cylindres urinaires	Cylindres de globules rouges.
4	Hématurie	> 5 g/champ en l'absence de lithiase, d'infection ou d'une autre cause.
4	Protéinurie	> 0,5 GR/24 heures. Apparition récente ou majoration récente de plus de 0,5 g/24 heures.
4	Pyurie	> 5 GB/champ en l'absence d'infection.
2	Nouveau rash	Apparition récente ou récidive d'un rash cutané inflammatoire.
2	Alopécie	Apparition récente ou récidive d'une alopécie en plaques ou diffuse.
2	Ulcères muqueux	Apparition récente ou récidive d'ulcérations orales ou nasales.
2	Pleurésie	Douleur thoracique d'origine pleurale avec frottement ou épanchement ou épaississement pleural.
2	Péricardite	Douleur péricardique avec au moins l'une des manifestations suivantes : frottement, épanchement ou confirmation électrographique ou échographique.
2	Baisse du complément	Diminution du CH50, du C3 ou du C4 < la normale inférieure du laboratoire.
2	Élévation des anti-ADN	Positivité > 25 % par le test de Farr ou taux > la normale du laboratoire.
1	Fièvre	> 38 °C en l'absence de cause infectieuse.
1	Thrombopénie	< 100 000 plaquettes/mm³.
1	Leucopénie	< 3 000 GB/mm³ en l'absence de cause médicamenteuse.

Tableau 11 - Niveau d'activité du LES selon le score SLEDAI

Score SLEDAI	Niveau d'activité
0	Aucune
1-5	Légère
6-10	Moyenne
11-19	Elevé
>20	Très élevé

Le LES peut suivre une évolution variable, allant d'une maladie relativement bénigne à une maladie évoluant rapidement vers une défaillance viscérale. Le taux de survie à cinq ans a considérablement augmenté, passant, chez les patients présentant une néphrite lupique, d'environ 55% dans les années 1970, à plus de 90% actuellement. L'amélioration de la survie des patients est liée à plusieurs facteurs. Parmi eux, un diagnostic et une prise en charge plus précoces, grâce à l'utilisation d'outils diagnostiques plus sensibles, des traitements de mieux en mieux ciblés et adaptés aux différentes situations cliniques, et la prise en charge rapide des complications viscérales[126].

Dans une méta-analyse sur plus de 27 000 patients lupiques, le taux de mortalité standardisé (SMR) global est trois fois supérieur à celui de la population générale. Les malades décèdent notamment, trois fois plus de maladies cardiovasculaires, cinq fois plus d'infections, et huit fois plus de maladies rénales. Le risque global de décès par cancer ne semble pas augmenter[127]. Cependant, pour certaines tumeurs spécifiques, en particulier le lymphome non hodgkinien, le risque est significativement accru (SMR=4.39)[128].

PARTIE 2 : DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-ADN NATIF

CONTEXTE - OBECTIF DU TRAVAIL

- ✓ **Evolution des pratiques**

Dans un contexte d'augmentation des demandes de dosage et de contraintes en terme de personnel ou d'accréditation, la technique ELISA « maison » devient difficile à conserver comme test principal. En effet, les biologistes doivent démontrer maintenir sur le long terme, la qualité des techniques de dosage, mais la norme ISO 15189, dont relèvent les laboratoires de biologie médicale, leur impose des procédures rigides et très contraignantes Les modifications induites par des changements de lots de réactifs, relativement réguliers, sont assez faciles à détecter et contrôler par la réalisation de séries en double en modifiant uniquement le paramètre étudié. Elles ne posent généralement pas de problème. Cependant, l'actuelle d'industrialisation et les fréquentes cessions d'actifs dans le domaine de la biologie, aboutissent parfois à des arrêts de production de réactifs, qui peuvent être imprévus et difficiles à remplacer. Ces incidents, bien que rares, nécessitent de nombreux tests qui sont complexes et lourds à effectuer pour des analyses aussi fréquentes que la recherche d'Ac anti-ADNn.

A contrario, lorsque l'on utilise une technique commerciale, le contrôle de la qualité est réalisé pour une bonne part par le fabricant, et son maintien à long terme plus souvent assuré dans les contrats analyseurs/réactifs négociés lors des appels d'offre. De plus, la traçabilité des différents réactifs (numéros de lots, dates de péremptions…) est intégrée dans les logiciels de contrôle de l'automate.

- ✓ **Travail en série**

Les techniques ELISA « maison » imposent un travail « en série », en posant sur chaque plaque l'ensemble des points de calibration et de contrôles. Compte tenu, du travail en duplicates, d'un puits supplémentaire pour de la vérification de l'absence de fixation non spécifique du sérum et de la survenue d'« effets de bord » (non détaillés dans ce travail), seulement 11 échantillons peuvent être dosés sur chaque plaque.

La mesure simultanée des Ac anti-ADN dénaturés et la durée incompressible de la technique, font qu'une série ne peut analyser que, au maximum, 44 sérums.

Nous avons donc souhaité comparer différentes techniques commerciales disponibles en fonction de profils de patients atteints de différentes formes de lupus, et à différents stades de la maladie, avec ceux de patients atteints d'autres connectivites (Sjögren, sclérodermies, myopathies inflammatoires…).

- ✓ **Démarche de l'étude**

On a tout d'abord définit, de manière rétrospective, des cohortes de lupus de différentes formes cliniques et de connectivites (groupes contrôles), grâce à une collaboration avec diverses spécialités médicales (médecine interne, dermatologie, néphrologie) ; puis il a fallu retrouver les prélèvements disponibles dans la sérothèque du laboratoire et les situer par rapport aux phases de diagnostic, de suivi ou de rechute ; sélectionner les techniques disponibles à l'aide des études déjà publiées et selon les propositions commerciales des firmes, pour les tests comparatifs ; et enfin analyser les échantillons sélectionnés avec les techniques choisies puis comparer les résultats pour les différentes cohortes afin de valider celle offrant les meilleurs résultats.

2. Matériels et méthodes

2.1 Population étudiée

Nous avons travaillé en lien avec les services de dermatologie, de néphrologie et de médecine interne du CHU de Caen. Nous leur avons adressé une liste de patients pour lesquels le laboratoire avait réalisé des recherches d'AAN entre 2009 et 2018, période pour laquelle une conservation des échantillons en sérothèque à -80°C pouvait avoir été effectuée au laboratoire. A partir de cette liste, des patients étiquetés « lupus » ont été sélectionnés. Pour chacun, les dossiers médicaux ont été consultés, et les dates de diagnostic, de poussées ou de rémission, ont été précisées. Cela a permis de répartir les échantillons en cinq sous-groupes : deux groupes de lupus systémiques aigus, l'un où le prélèvement correspondait à la date du diagnostic (LA DG), naïf de traitement, et l'autre correspondant à une poussée clinique (LA) ; deux groupes de lupus systémique en rémission (LR) partielle (LRP) ou complète (LRC), le caractère partiel ou complet étant lié à la présence, ou non, d'une symptomatologie résiduelle au moment du prélèvement ; et enfin un groupe de lupus cutanés (LC) dont un lupus induit (LI). Au total, 191 échantillons de patients lupiques ont été identifiés, mais seuls 128 échantillons, correspondant à 81 patients, ont été récupérés dans la sérothèque avec le volume minimal de 400 µL nécessaire pour effectuer l'ensemble des tests. L'étude précise des dossiers médicaux a permis de vérifier qu'aucun de ces patients n'avait été étiqueté « connectivite mixte » (MCTD), connectivite qui peut associer des signes cliniques et/ou biologiques de lupus, à ceux d'autres connectivites. Nous avons également relevé les autres paramètres biologiques couramment déterminés dans le LES : C3, C4, CH50, NFS et protéinurie.

Afin de contrôler la spécificité des tests, nous avons constitué un groupe contrôle de 34 patients atteints d'une connectivite cliniquement identifiée, non lupique, ni MCTD. Pour cette sélection, nous avons réalisé une extraction à partir du Système Informatique du Laboratoire (SIL), entre 2014 et 2018, de sérums avec des titres d'auto-Ac élevés. Cette extraction a été réalisée sur les auto-Ac suivants : anti-Scl70 pour les sclérodermies systémiques, -JO1, -PL7, -Mi2 pour les myosites auto-immunes, -Ro/SSA, -La/SSB pour les syndromes de Sjögren, -cardiolipine et -B2GP1 pour le SAPL primaire. Ces résultats biologiques, ainsi que l'étude des dossiers médicaux des patients retenus, ont été utilisés pour choisir la population contrôle, notamment pour vérifier l'absence de MCTD chez ces patients.

2.1.1 Population lupique

Nous avons sélectionné 128 échantillons de 81 patients, répartis en 5 sous-groupes selon l'évolution clinique (Figure 11).

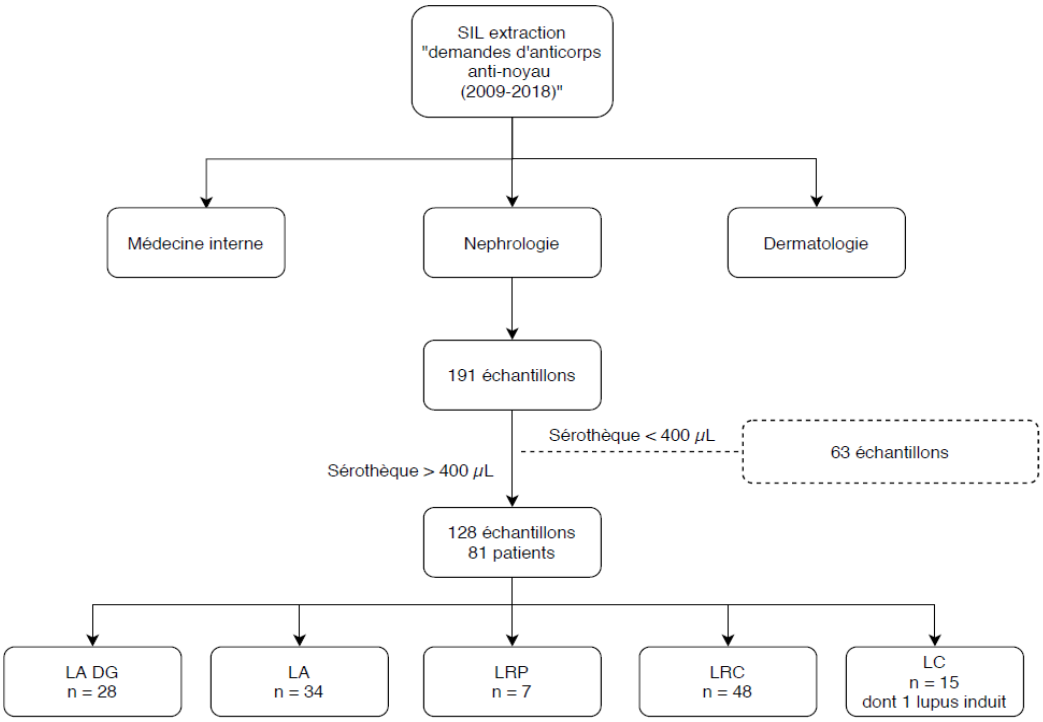


Figure 11 - Répartition des patients lupiques

2.1.2 Population non lupique

Nous avons sélectionné au total 34 patients atteints d'autres connectivites (Figure 12).

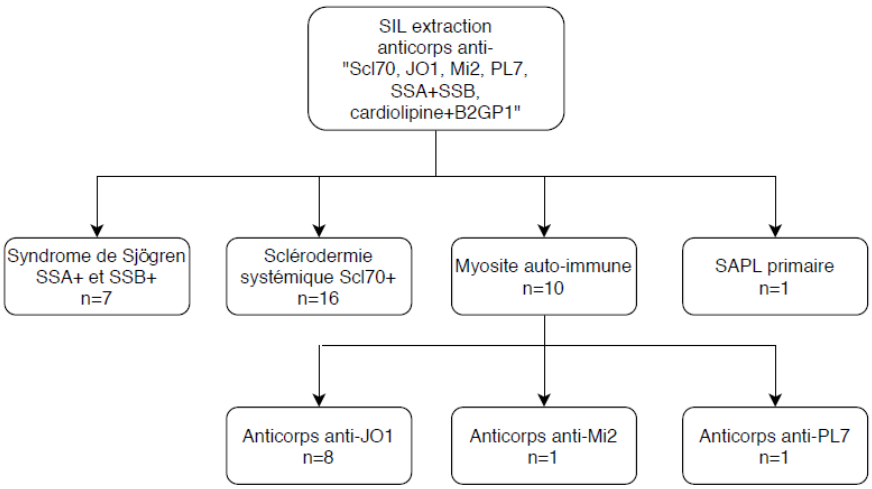


Figure 12 - Répartition des patients non lupiques

2.2 Techniques de dosage des anticorps anti-ADN natif comparées

2.2.1 ELISA « maison »

La technique actuellement utilisée au laboratoire d'Immunologie du CHU de Caen, est une technique ELISA mise au point au laboratoire en 1990, selon Preud'homme *et al.*[129], alors qu'aucune technique commerciale n'existait, et que l'on cherchait à éviter l'utilisation de l'Iode 125, nécessaire au test de Farr.

Pour la détection des Ac anti-ADNn, des microplaques en polystyrène de 96 puits sont recouvertes avec une solution d'ADN double brin, obtenue dissolution, en tampon PBS (0,2 mol/L) pendant 72 heures en agitation douce, d'ADN purifié de thymus de veau (Sigma®) (10 mg/100mL puis dilution au 7e). Pour valider le caractère « natif » ou « double-brin » de cet ADN, une partie de cette solution, dénaturée par choc thermique, fournit une solution d'ADN « dénaturé » (ADNd) ou « simple-brin », pour la détection en parallèle des Ac anti-ADN dénaturé. La fixation de l'ADNn au polystyrène nécessite un prétraitement des plaques avec du sulfate de protamine (0,5mg/mL). Les puits sont ensuite lavés et saturés avec du PBS-BSA 0,2%. Les plaques vidées, sont enfin séchées, puis conservées à -20°C. Elles peuvent être utilisées jusqu'à 8 semaines maximum.

Le sérum, est déposé, dilué au 100ème en PBS, et incubé deux heures. Après lavages, un antisérum polyclonal de chèvre, spécifique des chaînes gamma d'IgG humaines, couplé à la phosphatase alcaline (PAL) (Abliance®), est ajouté. La fixation est révélée par addition du substrat de la PAL, le para-nitrophénylphosphate (PNPP). La densité optique (DO) est mesurée à 30 minutes à 450nm. Les étapes de dilution et distribution des échantillons, standard et contrôles sont automatisées (Janus®, Perkin Elmer).

Cette technique est calibrée à l'aide de sérums de patients lupiques, poolés, quantifiés et conservés congelés à 80°C. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires par millilitre (UA/mL). Trois contrôles sont utilisés : un contrôle négatif avec le tampon, un contrôle « ADNn positif » calibré en Ac anti-ADNn et fortement positif en anti-ADNd ; un contrôle « ADNn négatif /ADNd positif », calibré en Ac anti-ADNd. Ce dernier contrôle est essentiel pour garantir la spécificité des Ac anti-ADNn.

Tous les échantillons sont testés en duplicates, et pour chacun, la fixation non spécifique sur un puits non recouvert d'ADN, mais recevant tous les autres réactifs, de toutes les étapes de préparation, est mesurée et soustraite du signal.

La gamme de mesure de la technique ELISA « maison » étant rapidement saturée, la quantification des échantillons très fortement positifs est faite par une série de dilutions manuelles au 1/3, lors du dosage suivant. Les échantillons les plus forts ont pu nécessiter des dilutions jusqu'au 81^{e}.

Enfin, les calibrations très rarement changées sont toujours évaluées par rapport au standard précédent, permettant la comparaison des résultats en UA dans le temps.

2.2.2 Techniques automatisées

2.2.2.1 Immunodosage par chimiluminescence

L'Ag est fixé sur support solide, souvent des microbilles. Le complexe [Ag-Ac] est révélé par un antisérum anti-IgG couplé au luminol. Le luminol, ou 3-aminophthalhydrazide, est une petite molécule organique qui devient luminescente en milieu oxydant. Pour émettre un photon, le luminol est mis en présence d'eau oxygénée. Le produit est l'ion aminophtalate. Ce produit est instable et retourne à l'état fondamental en libérant une molécule d'azote N2 et un photon. La lumière émise est mesurée par un luminomètre.[84]

Pour les automates de chimiluminescence, la quantité de luminescence générée est exprimée en RLU et est proportionnelle à la concentration des Ac IgG anti-ADNn. Celle-ci, exprimée en UI/mL, est calculée automatiquement en comparaison aux courbes de calibration.

La Figure 13 représente la réaction de chimiluminescence.

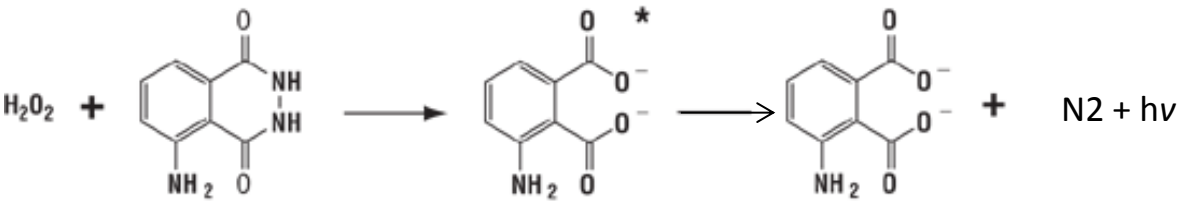


Figure 13 - Réaction de chimiluminescence

- **Werfen®, sur automate « Bioflash »**



Figure 14 - Automate Bioflash (source https://www.werfen.com/fr/fr/bio-flashr)

L'appareil dilue l'échantillon de sérum au 10^{e} et l'incube avec les billes magnétiques recouvertes d'ADNn synthétique et le tampon de dosage, à 37°C. Les billes sont aimantées et lavées à plusieurs reprises. Puis, l'antisérum anti-IgG humaine conjugué à l'isoluminol, est ajouté. Une réaction luminescente se produit et le système optique mesure la lumière produite.

Pour la quantification des Ac, le test utilise une courbe maîtresse spécifique du lot, prédéfinie en usine, qui est chargée dans l'appareil par le biais du code-barres de la cartouche de réactifs. Cet automate permet des dosages unitaires. En cas de taux élevé, une dilution automatique au 10^{e} peut être programmée.

- **ImmunoDiagnosticSystems®, sur automate « iSYS »**



Figure 15 - Automate iSYS (source http://www.makgrouphealthcare.com/laboratory/)

Ce test utilise, là encore, une méthode immunologique indirecte en deux étapes. L'ADNn, correspondant à un produit de PCR synthétique, est utilisé pour recouvrir des particules magnétiques qui constituent la phase solide. Le conjugué est une immunoglobuline

monoclonale anti-IgG humaine, marquée avec un dérivé de l'ester d'acridinium. Durant la première incubation, les Ac spécifiques se trouvant dans l'échantillon, dans les calibrateurs ou dans les contrôles se lient à l'ADNn fixé sur les billes. Durant la deuxième incubation, le conjugué réagit avec les Ac IgG anti-ADNn séquestrés par la phase solide. Après chaque incubation, le matériel non lié à la phase solide est éliminé par aspiration et lavages successifs. La quantité de conjugué marqué, restant lié à la phase solide, est évaluée par l'activation de la réaction de chimiluminescence et la mesure du signal lumineux. Cet automate ne permet pas une dilution automatique des échantillons à taux élevés. Une dilution manuelle est possible au 10^{e}, dans le tampon de dilution, dans la série suivante.

2.2.2.2 Immunodosage par émission de fluorescence

- **ThermoScientific®, sur automate « Phadia250 »**



Figure 16 - Automate Phadia 250 (source http://www.phadia.com)

Le Phadia (désormais Unicap) utilise un dosage immunoenzymatique automatisé, avec émission de fluorescence (Elia). Les supports sont revêtus avec de l'ADN plasmidique bicaténaire. Les Ac présents dans l'échantillon se lient aux Ag correspondants. Après élimination par lavage des Ac non liés, on ajoute un antisérum anti-IgG humaines couplé à une enzyme pour former un complexe Ac-conjugué. Après incubation, le conjugué non lié est éliminé par lavage et le complexe lié est incubé avec une solution de développement. Après l'arrêt de la réaction, on mesure la fluorescence du produit de la réaction. Plus cette dernière est élevée, plus il y a d'Ac IgG anti-ADNn dans l'échantillon. La fluorescence émise lors du dosage des échantillons de patients est comparée avec la courbe de calibration pour obtenir un résultat en UI/mL. En cas de taux élevé, une dilution automatique au 10^{e} peut être programmée.

2.3 Autres éléments techniques

2.3.1 Expression des résultats

Les résultats sont exprimés pour la technique maison en unité arbitraire par millilitre (UA/mL), le standard interne n'étant pas calibré en unités internationales. Pour les techniques automatisées, les résultats sont exprimés en unités internationales par millilitre (UI/mL) par rapport au standard international OMS WO/80, titré à 200 UI/mL, défini par l'OMS en 1985, à partir d'un patient lupique.[130] Il est désormais épuisé, et un nouveau standard d'origine humaine 15/174 a été mis au point. Il est distribué par le National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC), sa concentration est également de 200 UI/mL.[131]

2.3.2 Gammes de mesure

La gamme de mesure est propre à chaque fournisseur (Tableau 12). Au-delà de la zone de linéarité, une dilution du sérum est nécessaire afin de quantifier plus précisément les Ac.

Tableau 12 - Gamme de dosage des Ac anti-ADNn pour les différents tests

	Gammes de mesure des IgG anti-ADNn (/mL)	Dilution
Elisa « maison »	100-400 UA	Manuelle
Bioflash	9.8-600 UI	Automatique
iSYS	0-666.9 UI	Manuelle
Phadia	0- 379 UI	Automatique

2.3.3 Valeurs de référence

Pour chaque technique commerciale, un seuil de positivité est défini par le fabricant. Pour l'ELISA « maison », le seuil de détection fixé à 100 UA/mL a été calculé comme la moyenne +3 déviations-standards des résultats obtenus pour des sérums d'adultes sains donneurs de sang. Pour cette étude, nous avons défini une zone de signification incertaine comme « douteuse » entre 100 et 150 UA/mL, sur la base de l'expérience des biologistes du laboratoire. Ces zones sont définies pour chacun des tests dans le Tableau 13.

Tableau 13 - Valeurs normales des tests, selon les notices fabricant ou seuil du laboratoire

	NEGATIF	DOUTEUX	POSITIF
Elisa « maison » (UA/mL)	<100	[100-150]	>150
Bioflash (UI/mL)	<27	[27-35]	>35
iSYS (UI/mL)	<30	[30-50]	>50
Phadia(UI/mL)	<10	[10-15]	>15

2.3.4 Interférences

Certaines interférences peuvent être à l'origine d'une perturbation de la réaction, et donc fausser les résultats.

Pour l'ELISA « maison », l'absence d'interférence de ces éléments a été vérifiée, sans doute due à la dilution du sérum au 100ème.

Sur le Bioflash, les échantillons contenant jusqu'à 10 mg/dL de bilirubine, 200 mg/dL d'hémoglobine, 1000 mg/dL de triglycérides, 224 mg/dL de cholestérol ou 947 UI/mL de facteur rhumatoïde IgM (FRM) n'ont produit aucune interférence sur le dosage des Ac anti-ADNn (notice fabricant).

L'iSYS n'est pas influencé par la bilirubine, l'hémoglobine ou les acides gras jusqu'à une concentration de 20, 500 et 3000 mg/dL respectivement, mais ne recommande pas d'utiliser d'échantillons lipémiques ou hémolysés (notice fabricant).

Pour le Phadia, il est recommandé de ne pas utiliser d'échantillons lipémiques ou hémolysés (notice fabricant).

2.3.5 Récapitulatif technique

Une courbe de calibration est réalisée pour chacun des automates et deux contrôles de qualité interne (CQI) : un positif et un négatif sont testés pour chacun des automates. Les CQI doivent encadrer chacune des séries, selon une procédure à définir au laboratoire, conforme à la norme ISO 15189. Ils doivent être dans les bornes définies dans la notice fabricant. Pour les automates Bioflash et iSYS, une courbe usine appelée « courbe maitresse » est chargée sur l'automate à chaque changement de lot de réactif. Les contrôles de calibration doivent être superposables à cette courbe maitresse. Le Tableau 14 récapitule les différences techniques entre les tests.

Tableau 14 - Récapitulatif technique des différents tests

Technique	Source d'ADN	Nature de l'antisérum	Prise d'essai	Fréquence de calibration	Contrôle de calibration	CQI	Conservation des réactifs	Capacité (nb d'éch)	Délai de rendu
ELISA « maison »	Purifié (Thymus de veau)	Polyclonal anti-Fcγ humaine	10 µL	A chaque technique	5 en duplicats	1 positif 1 négatif 1 ADNd	Réactifs à 4°C Plaques 8 semaines à -20°C	44 par série	Résultats en 4h/série
Bioflash	Synthétique	Polyclonal anti-IgG humain	15 µL	Au changement de lot de réactif (courbe maitresse)	2 en triplicats	1 positif 1 négatif	A bord*, jusqu'à péremption	30 rechargeable	1er résultat en 30 min puis 1/min
iSYS	Synthétique (Produit de PCR)	Monoclonal anti-IgG humaine	4 µL	28 jours et au changement de lot de réactif (courbe maitresse)	2 en triplicats	1 positif 1 négatif	A bord*, 60 jours	120 rechargeable	1er résultat en 25 min puis 1/min
Phadia	Synthétique recombinant (Plasmide d'*E. coli*)	Polyclonal anti-IgG humaine	9 µL	28 jours et au changement de lot de réactif	6 en duplicats	1 positif 1 négatif	A bord*, 28 jours	50 rechargeable	1er résultat en 2h puis 1/min

** enceinte réfrigérée*

2.4 Analyse des données

2.4.1 Analyse statistique

Les résultats des différents fournisseurs ont été extraits des automates en format .csv puis les interprétations ont été réalisées sur Excel (version 2016).

Les droites de corrélation ont été réalisées sur le logiciel Excel (version 2016).

Les courbes ROC et les statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad (version 8.3).

Les indices de significativité évalués sur GraphPad, représentés par des « * », correspondent à une p-value définie dans le Tableau 15.

Tableau 15 - Indices de significativité évalués sur GraphPad

Acronyme	p-value
ns	> 0,05 (non significatif)
*	0,01 à 0,05
**	0,001 à 0,01
***	0,0001 à 0.001
****	< 0,0001

Le calcul des index Kappa ont été réalisés sur GraphPad en ligne : https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/

2.4.2 Calcul des performances

La sensibilité d'un test correspond à la probabilité que le test soit positif si la personne est atteinte de la maladie. C'est le nombre de vrais positifs sur le nombre total de personnes atteintes de la maladie. La spécificité d'un test correspond à la probabilité que le test soit négatif si la personne est indemne de la maladie. C'est le nombre de vrais négatifs sur le nombre total de personnes indemnes de la maladie.

La valeur prédictive positive d'un test correspond à la probabilité que la personne soit réellement atteinte de la maladie si le test est positif. C'est le nombre de vrais positifs sur le nombre total de personne dont le test est positif. La valeur prédictive négative d'un test correspond à la probabilité que la personne soit réellement indemne de la maladie si le test est négatif. C'est le nombre de vrais négatifs sur le nombre total de personnes dont le test est négatif.

Le Tableau 16 permet de définir les performances des tests.

Tableau 16 - Tableau de contingence pour le calcul des performances des tests

		Maladie		
		Oui	**Non**	
Test	**positif**	vrai positif (VP)	faux positif (FP)	total tests positifs
	négatif	faux négatif (FN)	vrai négatif (VN)	total tests négatifs
		total malades	total non malades	effectif total

Ainsi,

Sensibilité (Se) = VP / (VP+FN) = VP / total malades

Spécificité (Spé) = VN / (VN+FP) = VN / total non malades

Valeur prédictive positive (VPP) = VP / (VP+FP) = VP / total tests positifs

Valeur prédictive négative (VPN) = VN / (VN+FN) = VN / total tests négatifs

2.4.3 Construction des courbes ROC et calcul des index de Youden

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) correspond à une représentation graphique de la relation qui existe entre la sensibilité et la spécificité d'un test. Un test qui discrimine parfaitement les sujets malades des sujets indemnes de la maladie donnera une courbe ROC ayant une aire sous la courbe (AUC) de 1 ou 100%.

La courbe ROC permet, pour chaque « marche » de l'escalier, de déterminer une sensibilité et une spécificité. Un index de Youden (Y) est calculable pour chaque palier. Il permet de mesurer l'efficacité d'une méthode diagnostique et dépend de la sensibilité et de la spécificité du test. Il se calcul de cette façon : (Y) = Se + Spé – 1, et est compris en 0 et 1. Plus l'index de Youden est proche de 1, plus le test est efficace.

Choisir l'index de Youden le plus élevé (Ymax) permet ainsi de définir le seuil optimal pour obtenir le meilleur rapport sensibilité / spécificité. Cet index a été déterminé pour chaque test.

2.4.4 Index Kappa ou concordance clinique

L'index Kappa (K) permet de quantifier le niveau de concordance clinique entre deux tests. Le Tableau 17 permet de définir cet index.

Tableau 17 - Tableau de contingence pour le calcul de l'index Kappa

		Test B		
		Positif	Négatif	
Test A	Positif	a	b	n_1
	Négatif	c	d	n_2
		n_3	n_4	N

Les résultats concordent lorsque les deux interprétations amènent à la même conclusion : situations a (test A et test B positifs) et d (test A et test B négatifs).

La comparaison de la fréquence de ces résultats concordants, par rapport à l'ensemble des résultats, permet d'obtenir la proportion de réponses concordantes observée (Po) : $Po = (a+d)/N$.

Toutefois, une partie de la concordance observée est liée au hasard : c'est la concordance aléatoire, ou la proportion de résultats concordant par chance (Pc). Elle correspond au rapport entre la somme des produits marginaux des résultats concordants et le carré du nombre total de résultats : $Pc = (n_1.n_3+n_2.n_4)/N^2$.

L'index kappa (K) quantifie le niveau de concordance réelle entre les résultats de 2 tests. Il est déterminé en tenant compte des deux paramètres précédents et $K = (Po-Pc)/(1-Pc)$. Plus K se rapproche de 1, plus la concordance des résultats est importante (Tableau 18).

Tableau 18 - Interprétation du degré d'accord entre deux méthodes, selon l'index Kappa

Accord	Index Kappa
Excellent	> 0,80
Bon	$0,61 \leq \kappa \leq 0,80$
Moyen	$0,41 \leq \kappa \leq 0,60$
Faible	$0,21 \leq \kappa \leq 0,40$
Très faible	$0 \leq \kappa < 0,20$
Désaccord	< 0

3. Résultats

3.1 Caractéristiques de la cohorte lupique

3.1.1 Epidémiologie

Cette cohorte est constituée de 66 femmes (81%) et 15 hommes (19%) pour 128 échantillons. Leur répartition par tranche d'âge est représentée dans la Figure 17. On retrouve une prédominance féminine avec un âge majoritairement inférieur à 40 ans.

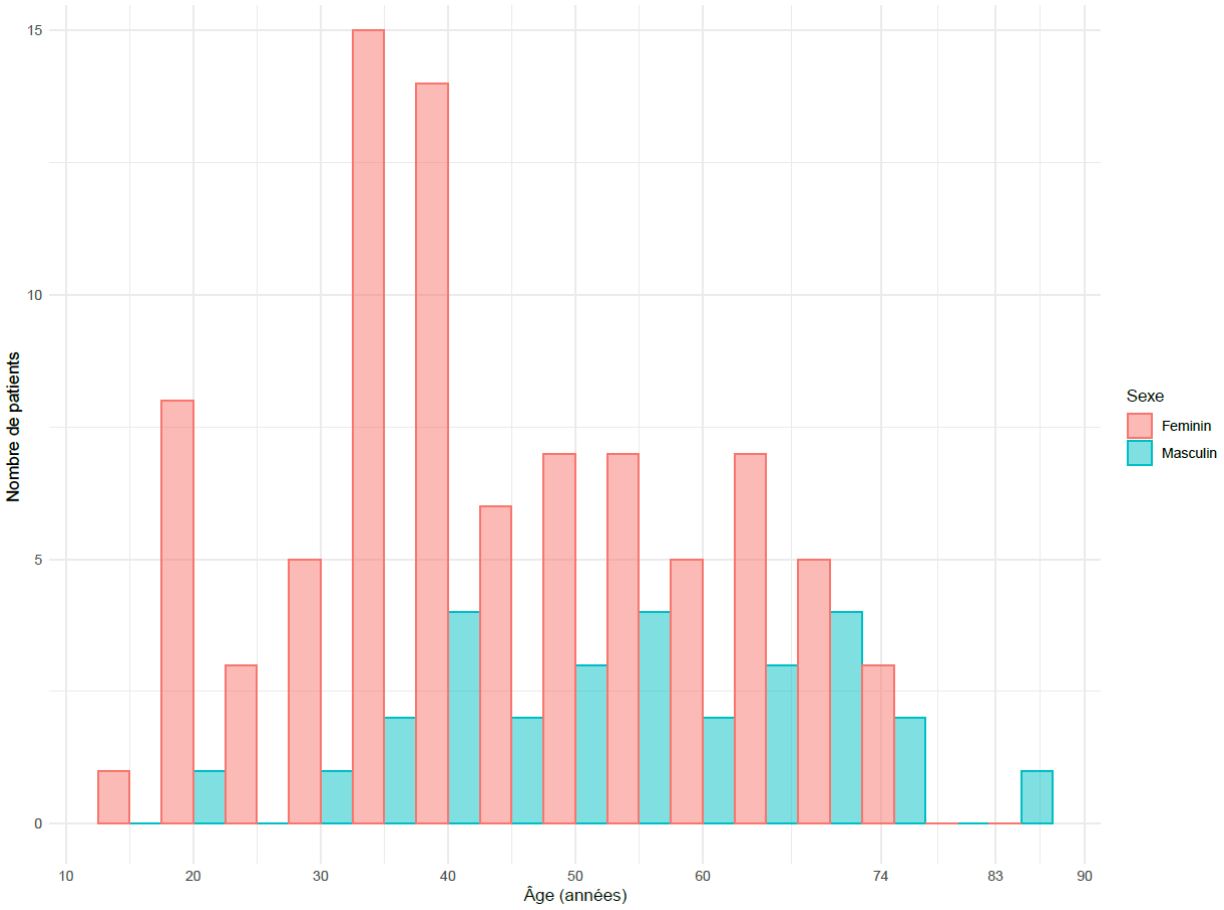


Figure 17 - Répartition des patients par classe d'âge

3.1.2 Caractéristiques cliniques au diagnostic

Le Tableau 19 décrit les atteintes cliniques observées au diagnostic pour les 28 patients de la cohorte (sous-groupe LA DG). Les atteintes correspondaient à l'hétérogénéité clinique du LES. Les 13 patients présentant une néphrite lupique étaient classifiés de la manière suivante : 1 avec lésion mésangiale minime de classe I, 9 avec une néphrite lupique de classe IV, 2 avec GEM lupiques de classe V, et 1 avec GEM lupique de classe V+III.

Tableau 19 - Atteintes cliniques des patients inclus au diagnostic (LA DG)

Clinique	Nombre de patients n=28 (%)
Cutanée	13 (46,4%)
Articulaire	17 (60,7%)
Rénale	13 (46,4%)
Sérites (péricardite et pleurésie)	6 (5 et 1) (21,4%)
Hématologique (Plq <100 et/ou Ly <1G/L)	10 (35,7%)
Neurologique	2 (7,1%)
Myocardite	1 (3,6%)
Hépatite	1 (3,6%)

3.1.3 Paramètres biologiques

Les marqueurs hématologiques et immunologiques ont été relevés pour l'ensemble des patients et sont décrits dans le Tableau 20.

Tableau 20 - Anomalies biologiques relevées, en pourcentage, par catégorie clinique

	Seuil	LA DG (%)	LA (%)	LRP (%)	LRC (%)	LC/LI (%)	Non LES (%)
CH50 consommé	< 75 %	35	44	20	30	19	0
C3 consommé	< 640 mg/L	28	36	20	15	13	0
C4 consommé	<100 mg/L	40	42	20	23	25	0
Leucopénie	< 4 G/L	18	13	0	22	14	3
Lymphopénie	< 1 G/L	61	66	75	58	47	52
Thrombopénie	< 100 G/L	4	3	0	3	7	3

Le complément (CH50, C3, C4) semble davantage consommé lors des phases actives de la maladie que lors des rémissions, mais sans différence significative. Il est cependant davantage consommé dans les poussées lupiques que dans les LC (p=0.02 versus LADG et p=0.002 versus LA) et dans les non lupus (p<0.0001). Les patients non lupiques sont moins leucopéniques. Les traitements des patients non lupiques n'ont pas été relevés. Environ la moitié de notre cohorte présente une lymphopénie, probablement liée à l'activité de la maladie, et aux traitements. Elle est fréquente dans tous les groupes sans différence significative entre eux. La thrombopénie est rare chez les patients lupiques comme chez les patients non lupiques.

3.1.4 Traitements reçus

Le Tableau 21 représente les traitements reçus par les patients selon leur catégorie clinique.

Aucun des LA DG ne recevait de traitement. La courbe ROC et les indices de performance des tests n'ont donc pas été influencés par ces derniers.

Les patients ayant un LES en rémission partielle ou complète sont davantage traités par immunosuppresseurs (57% (p>0,05) et 53% (p=0,02) respectivement) que les patients en poussées (24%). Les LC sont majoritairement traités par antipaludéen de synthèse seul. Le LI était traité pour sa maladie de Crohn par méthotrexate, adalimumab et glucocorticoïdes, sans traitement spécifique pour son lupus.

Tableau 21 - Traitements reçus par les patients selon la catégorie clinique de lupus
AINS = anti-inflammatoire non stéroïdien ; HCQ = hydroxychloroquine ; GC = glucocorticoïdes ; IS = immunosuppresseur ; AVK = antivitamine K

	LA	LRP	LRC	LC
Donnés disponibles pour n patients	30	7	34	10
AINS	1	0	1	0
HCQ	16	4	18	6
GC	11	1	8	0
IS	7	4	18	0
AVK	1	1	5	0
Pas de traitement ou Rupture de traitement	7	0	2	4

3.2 Anticorps anti-ADN natif

3.2.1 Résultats bruts par technique

Les résultats des Ac anti-ADNn de la technique ELISA « maison » sont ceux obtenus au laboratoire au fur et à mesure de la réception initiale de ces échantillons. Les dosages ont été effectués sur chaque automate entre les mois de mai et juillet 2019. Chaque échantillon était

décongelé à température ambiante pour le test puis recongelé entre les tests. Le temps maximal passé à température ambiante était de 4 heures.

La Figure 18 représente la répartition des Ac IgG anti-ADNn pour chacun des tests, pour chaque sous-groupe clinique de LES et pour le groupe contrôle « non LES ».

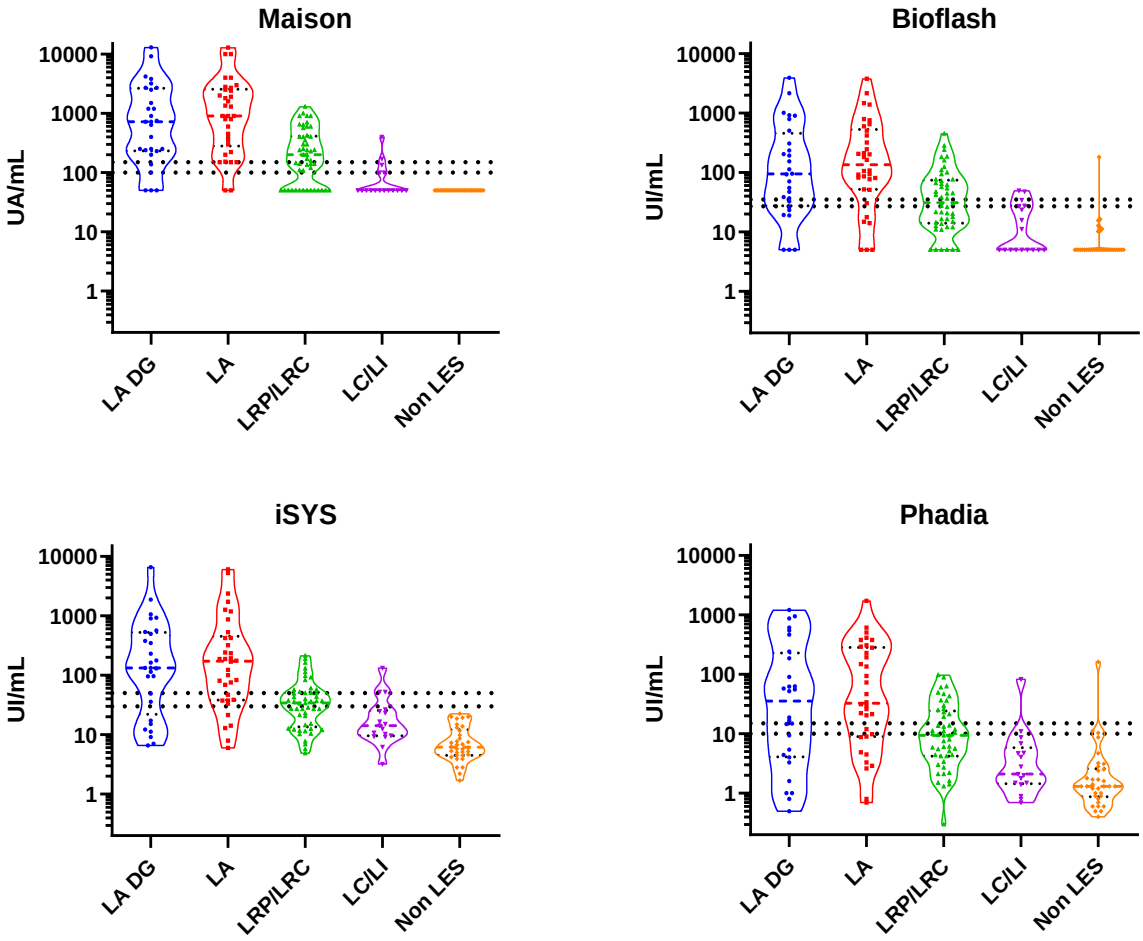


Figure 18 – Représentation graphique de la répartition des Ac anti-ADNn pour chaque sous-groupes. Les deux lignes en pointillés représentent la zone de signification incertaine, dite « douteuse » des résultats.

Les médianes (Q2) et les quartiles (Q1-Q3) des IgG anti-ADNn sont représentés dans le Tableau 22, et les indices de significativité de la comparaison des taux médians entre les différentes catégories cliniques sont représentés dans le Tableau 23.

Tableau 22 - Médianes (Q2) et quartiles (Q1-Q3) des taux d'Ac IgG anti-ADNn, en U/mL

		LA DG	LA	LRP/LRC	LC/LI	Non LES
ELISA « maison »	Q2	720	900	200	< 100	<100
	Q1-Q3	232-2650	281-2550	50-412	/	/
Bioflash	Q2	94	136	31	<9,8	<9,8
	Q1-Q3	28-455	52-529	14-74	<9,8-28	/
iSYS	Q2	133	173	34	14	6.2
	Q1-Q3	22-256	38-450	14-51	10-26	4,5-12
Phadia	Q2	35	33	9.4	2.1	1.3
	Q1-Q3	4-227	9-282	4,2-24	1,5-6	0,9-2,6

Tableau 23 - Indices de significativité de la comparaison des taux médians entre chaque sous-groupes et pour chaque test

	M	B	I	P
LA DG vs. LA	ns	ns	ns	ns
LA DG vs. LRP/LRC	*	ns	ns	ns
LA DG vs. LC/LI	****	***	**	**
LA DG vs. Non LES	****	****	****	****
LA vs. LRP/LRC	***	*	**	ns
LA vs. LC/LI	****	****	***	***
LA vs. Non LES	****	****	****	****
LRP/LRC vs. LC/LI	ns	ns	ns	ns
LRP/LRC vs. Non LES	****	****	****	****
LC/LI vs. Non LES	ns	ns	ns	ns

Pour chacun des tests, les taux médians d'IgG anti-ADNn ne sont pas significativement différents entre les LA DG et les LA. Ils ne sont pas non plus significativement différents entre les LR et les LC et entre les LC et les non LES, quel que soit le test. Il n'est pas observé, pour les techniques automatisées, de différence significative des taux médians entre les LA DG et les LR, contrairement à l'ELISA « maison ». On observe une différence significative entre les LA et les LR sauf pour le Phadia. Ils sont cependant significativement différents entre les autres sous-groupes de lupus, et entre les lupus et les non lupus.

Ces taux sont donc cohérents avec la clinique pour chacun des fournisseurs et valide ainsi la sélection des échantillons utilisés pour cette étude.

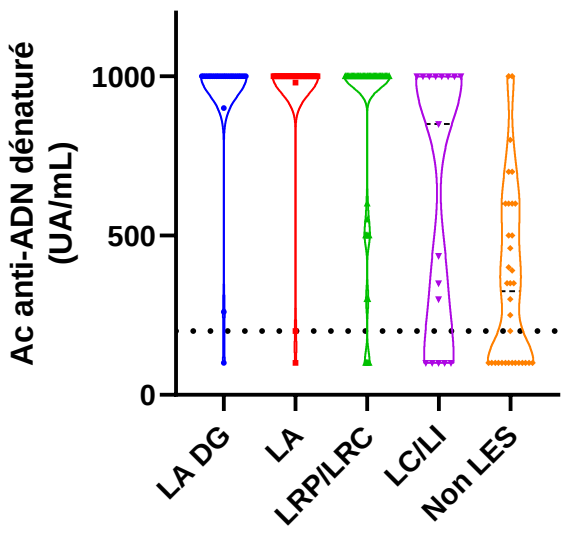
3.2.2 Intérêt des dilutions

Pour suivre l'efficacité des traitements et l'amélioration clinique de la maladie, il est important de quantifier précisément les Ac anti-ADNn. Il faut donc diluer les échantillons lorsque les résultats sortent de la gamme de mesure. Pour les techniques automatisées, les gammes de mesure étant plus étendues, ces dilutions n'ont été réalisées que 13 fois sur le Bioflash 12 fois sur l'iSYS et 10 fois sur le Phadia (aucune chez les patients en rémission. Pour l'ELISA « maison », 52 sérums ont nécessité au moins une dilution

3.3 Ac anti-ADN dénaturé

Nous avons pu mesurer les taux d'Ac IgG anti-ADNd par la technique ELISA « maison ». Le seuil de négativité est à 200 UA/mL. Nous avons donc attribué arbitrairement un résultat à 1000 pour tous ceux supérieurs à 1000.

La Figure 19 montre les taux d'Ac IgG anti-ADN dénaturé dans les différents sous-groupes de lupus et dans le groupe contrôle.



LA DG vs. LA	ns
LA DG vs. LRP/LRC	ns
LA DG vs. LC/LI	*
LA DG vs. Non LES	****
LA vs. LRP/LRC	ns
LA vs. LC/LI	*
LA vs. Non LES	****
LRP/LRC vs. LC/LI	ns
LRP/LRC vs. Non LES	****
LC/LI vs. Non LES	ns

Figure 19 – Ac IgG anti-ADNd dans les différents sous-groupes de LES et non LES.

Le seuil de positivité est représenté par la ligne noire en pointillés. La comparaison des médianes avec les indices de significativité est représentée dans le tableau juxtaposé.

Les taux médians et les quartiles d'ADNd sont représentés dans le Tableau 24.

Tableau 24 - Médianes (Q2) et quartiles (Q1-Q3) des taux d'Ac IgG anti-ADNd, en UA/mL

ELISA « maison »	LA DG	LA	LRP/LRC	LC/LI	Non LES
Q2	1000	1000	1000	850	325
Q1-Q3	1000-1000	1000-1000	800-1000	100-1000	100-600

On observe des taux médians très élevés (>1000 UA/mL) pour tous les LA et les LR, sans différence significative entre eux. Ils sont très élevés dans les LC/LI, mais sont significativement plus faibles pour les non LES (p<0.0001).

3.4 Cas des néphropathies lupiques

Sur les 28 LA DG, 13 patients étaient atteints d'une néphrite lupique (NL) et leurs protéinuries (sur échantillon urinaire) étaient significativement supérieures à celles des patients sans néphrite lupique (p<0,0001).

La répartition des taux d'Ac anti-ADNn des taux d'Ac anti-ADNn chez les patients avec et sans néphrite lupique au diagnostion est représentée dans la Figure 20, les médianes et les quartiles sont précisés dans le Tableau 25.

Les médianes d'Ac anti-ADNn étaient significativement plus élevées chez les patients avec néphrite lupique que chez les patients sans néphrite lupique pour les quatre tests.

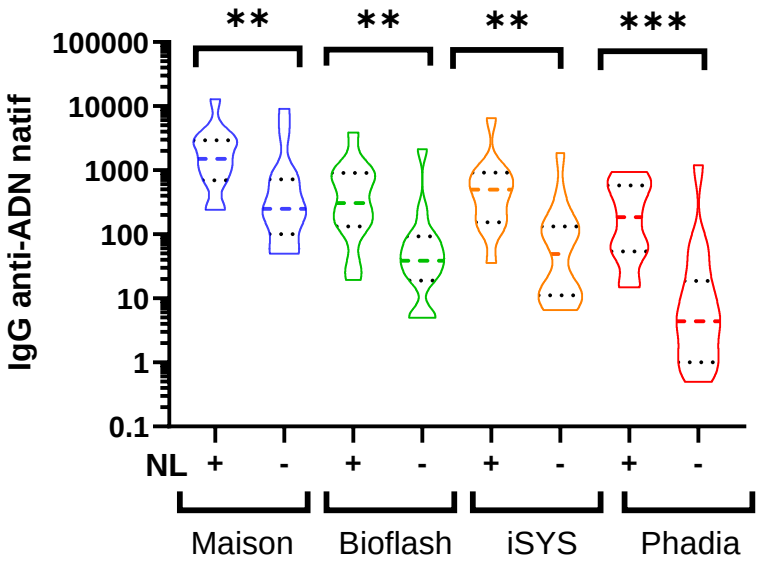


Figure 20 - Répartition des Ac anti-ADNn chez les patients NL+/NL- au diagnostic, pour chaque test

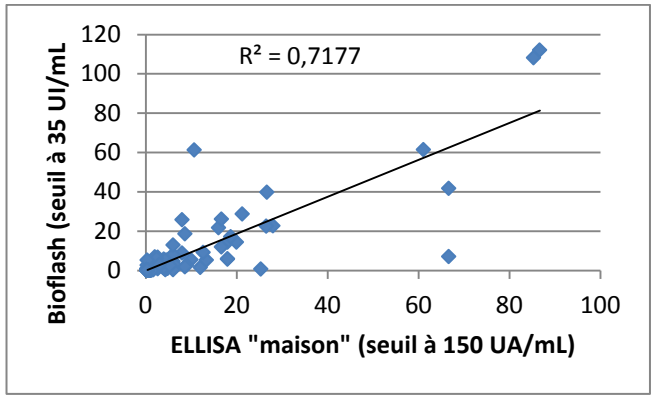
Tableau 25 - Médianes (Q2) et quartiles (Q1-Q3) des taux d'Ac IgG anti-ADNn pour les néphrites lupiques au diagnostic, en UA/mL

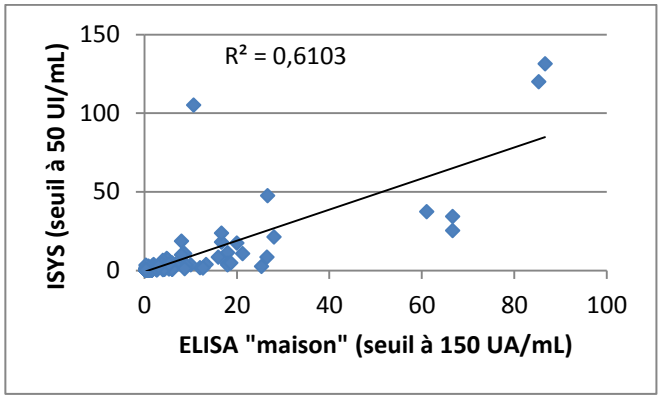
	ELISA « maison »		Bioflash		iSYS		Phadia	
	NL+	**NL-**	**NL+**	**NL-**	**NL+**	**NL-**	**NL+**	**NL-**
Q2	1500	250	309	38,5	496	49,3	186	4,4
Q1-Q3	695-2945	100-720	133-909	18,9-92,6	155-913	11,2-133	53,8-578	1,0-18,7

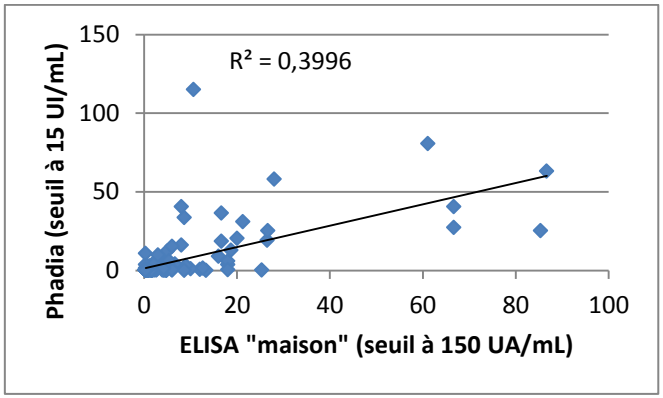
3.5 Corrélation entre les tests

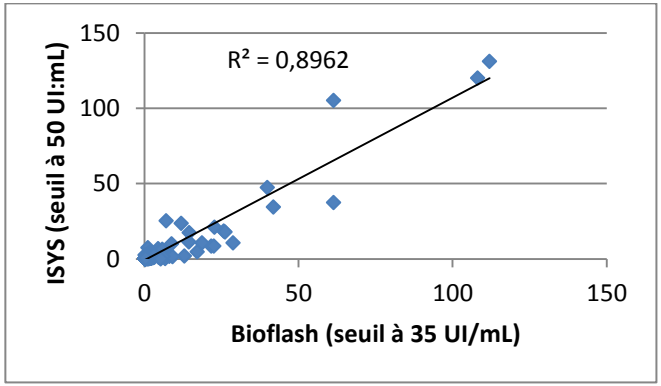
Nous avons analysé les corrélations entre les techniques, deux à deux (Tableau 26). Cependant, les valeurs affichées en « unité arbitraire » ou « unité internationale » ne sont pas comparables d'un système analytique à l'autre. Les corrélations ont donc été établies en rapport résultat brut / seuil de positivité de la technique. D'après les droites et les coefficients de corrélation ci-dessous, on peut conclure que l'automate le mieux corrélé à l'ELISA maison est le Bioflash ; les deux techniques les mieux corrélées entre elles sont celles qui utilisent la méthode de dosage par CLIA (Bioflash et iSYS) ; l'immunodosage Elia sur le Phadia est la technique la moins corrélée aux autres.

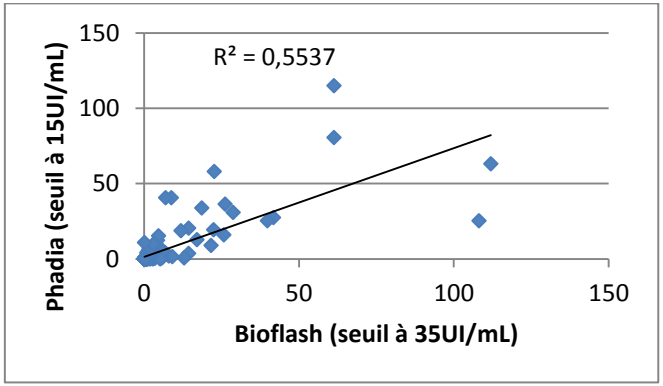
Tableau 26 – Corrélations deux à deux des différentes techniques de dosage des Ac anti-ADNn

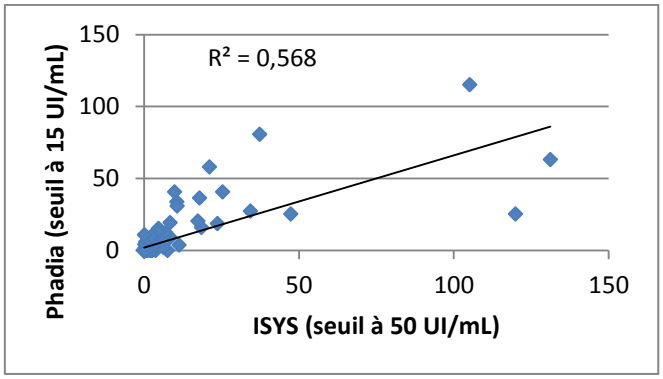












3.6 Performances initiales des tests

Pour le calcul des indices de performance, ont été utilisés les résultats des échantillons de patients atteints de LES aigus prélevés au diagnostic avant traitement (LA DG, n=28), et les résultats des échantillons des patients non lupiques (n=34). Les patients atteints de LC et le LI, qui n'ont pas d'Ac anti-ADNn, n'ont pas été utilisés. Dans un premier temps, les seuils fabricants (F) ont été utilisés et les résultats dits « douteux » n'ont pas pu être utilisés (2 pour la technique maison, 1 pour le Bioflash, 2 pour l'iSYS et 4 pour le Phadia). Le Tableau 27 reprend les performances de chacun des tests.

Les techniques automatisées tendent à être moins sensibles par rapport à la technique « maison », mais cette différence n'est significative qu'avec le test Phadia ($p<0.001$). Il n'y a pas de différence significative pour la spécificité entre les techniques. A noter que la technique « maison » et l'iSYS ne détectent aucun faux positif dans notre cohorte.
un nouveau seuil de positivité (Y) pour lequel l'index de Youden est maximal.

Tableau 27 – Récapitulatif des performances initiales (F) et calculées (Y)

Test	Seuil utilisé	Seuil de négativité (U/mL)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
ELISA maison	F	100	88,5	100	100	91.9
	Y	100	89.3	100	100	91,9
Bioflash	F	27	74,1	97,1	95,2	92,5
	Y	17.5	89.3	97.1	96,2	91,7
iSYS	F	30	73,1	100	100	82,9
	Y	30	75.0	100	100	82,9
Phadia	F	3.3	61,5	96,9	94,1	75,6
	Y	10	82,1	85,3	82,1	85,3

3.7 Courbes ROC

Les courbes ROC (Figure 21) permettent de déterminer la capacité d'un test à discriminer les sujets atteints de maladie des sujets non atteints, et la comparaison des AUC Tableau 28 permet de comparer les tests entre eux.

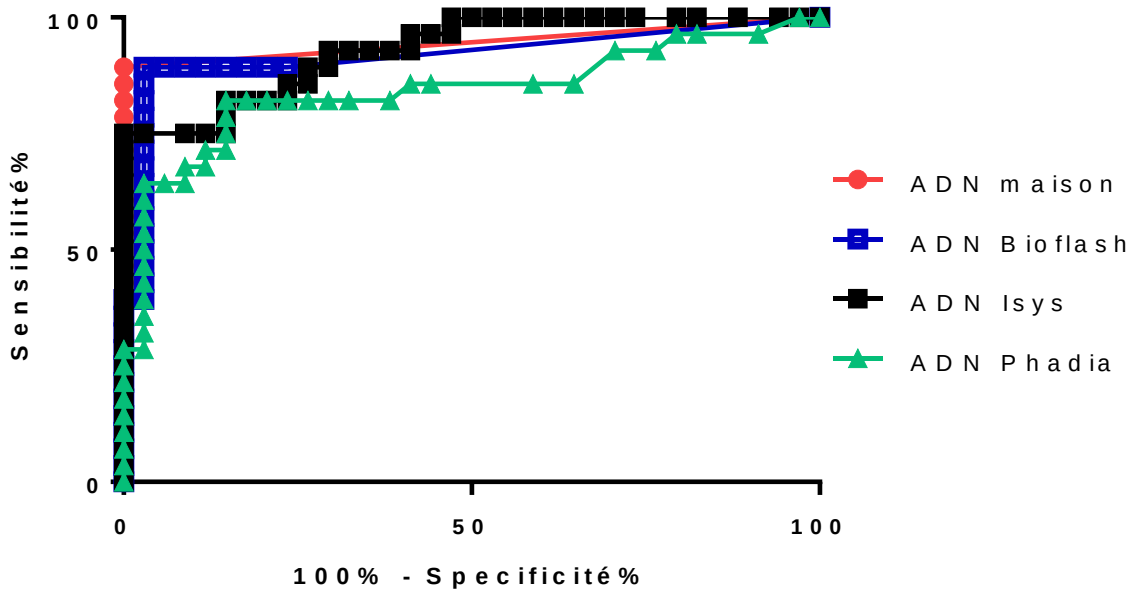


Figure 21 - Courbes ROC définies pour chaque technique

L'$IC_{95\%}$ correspond à l'intervalle de confiance du calcul avec un risque d'erreur de 5%.

Tableau 28 - Aires sous la courbe selon les tests

	AUC	$IC_{95\%}$
ELISA « maison »	0.95	0.88 – 1.01
Bioflash	0.91	0.84 – 1.00
iSYS	0.93	0.87 - 0.99
Phadia	0.84	0.74 - 0.95

Les AUC permettent de classer les tests du plus au moins discriminant : ELISA « maison », iSYS, Bioflash, Phadia.

3.8 Performances calculées des tests

A partir des courbes ROC, on peut calculer la valeur seuil permettant d'obtenir des performances maximales en calculant l'index de Youden. A partir de ces nouveaux seuils, on peut s'affranchir de la zone d'incertitude des fournisseurs, et réintégrer des résultats précédemment interprétés comme « douteux ». Les seuils ont été abaissés de façon plus

marquée pour le Phadia et le Bioflash, d'un facteur 3 et 1.5 respectivement, alors qu'ils sont identiques pour la technique maison et l'iSYS.

On note une nette amélioration des performances des différentes techniques. L'index de Youden a permis d'améliorer la sensibilité (+15%, non significatif) du Bioflash sans dégrader sa spécificité. Il a également permis d'améliorer la sensibilité du Phadia (+21%, $p<0.01$) mais au détriment d'une perte de spécificité (-12%, non significatif). Concernant l'iSYS, le nouveau seuil de positivité à 30 UI/mL est identique au seuil de négativité du fournisseur, ce qui permet de réintégrer les résultats « douteux » entre (30-50 UI/mL) comme « positifs faibles ». Pour l'ELISA « maison », le seuil (Y) est en fait le seuil usuel de la technique et les performances entre F et Y ne changent pas significativement.

3.9 Concordance entre les tests

Le coefficient Kappa a été calculé avec les seuils (F) et avec les seuils (Y) et sont représentés dans le Tableau 29.

Tableau 29 - concordances entre les tests selon le type de seuil (F) ou (Y) choisi

	Maison Bioflash	**Maison iSYS**	**Maison Phadia**	**Bioflash iSYS**	**Bioflash Phadia**	**iSYS Phadia**
Kappa seuils F	0.60	0.59	0.44	0.63	0.54	0.50
Concordance	Bonne	Moyenne	Moyenne	Bonne	Moyenne	Moyenne
Kappa seuils Y	0.71	0.71	0.54	0.72	0.53	0.47
Concordance	Bonne	Bonne	Moyenne	Bonne	Moyenne	Moyenne

La concordance d'interprétation des résultats est bonne entre l'ELISA « maison » et le Bioflash et entre le Bioflash et iSYS. Elle passe de moyenne à bonne en utilisant le seuil Y entre l'ELISA maison et l'iSYS, c'est-à-dire en intégrant les patients douteux iSYS comme positifs. La concordance reste moyenne entre le Phadia et les autres techniques, quel que soit le seuil.

3.10 Cas discordants

L'étude des cas discordants est une étape cruciale pour le choix de la technique. En effet, il est nécessaire de réduire au maximum le nombre de faux positifs et de faux négatifs pour les cliniciens pour que le test soit une aide au diagnostic. C'est le seuil Y a été utilisé pour l'interprétation des résultats.

Nous avons défini 3 situations de concordance analytique

- ✓ Si les quatre techniques apportent la même interprétation brute du résultat (positif ou négatif, alors le dossier est considéré comme concordant, n=106 (65%) ;
- ✓ Si trois des quatre techniques sont concordantes, alors la quatrième technique de dosage est considérée comme discordante, n=40 (25%) ;
- ✓ Si 50% des résultats des résultats sont discordants, alors le dossier a été révisé par un clinicien, n=16 (10%).

3.10.1 Analyse des discordances d'une seule technique

La Figure 22 représente la répartition des résultats discordants d'une seule technique, alors que les trois autres sont concordantes. Il est intéressant de noter que dans les 40 cas où 3 des 4 tests apportent la même interprétation du résultat, le Phadia est discordant à 21 reprises : 7 fois rendus négatifs et 14 fois rendus positifs. Il faut cependant relativiser ces « positifs » chez Phadia car, dans 13 cas sur 14, il s'agit de faibles positifs < 15 UI/mL. L'utilisation des seuils F les auraient donc rendus négatifs ou équivoques mais il y aurait eu plus de négatifs. Les sept résultats rendus négatifs, par contre, sont largement positifs avec les autres tests.

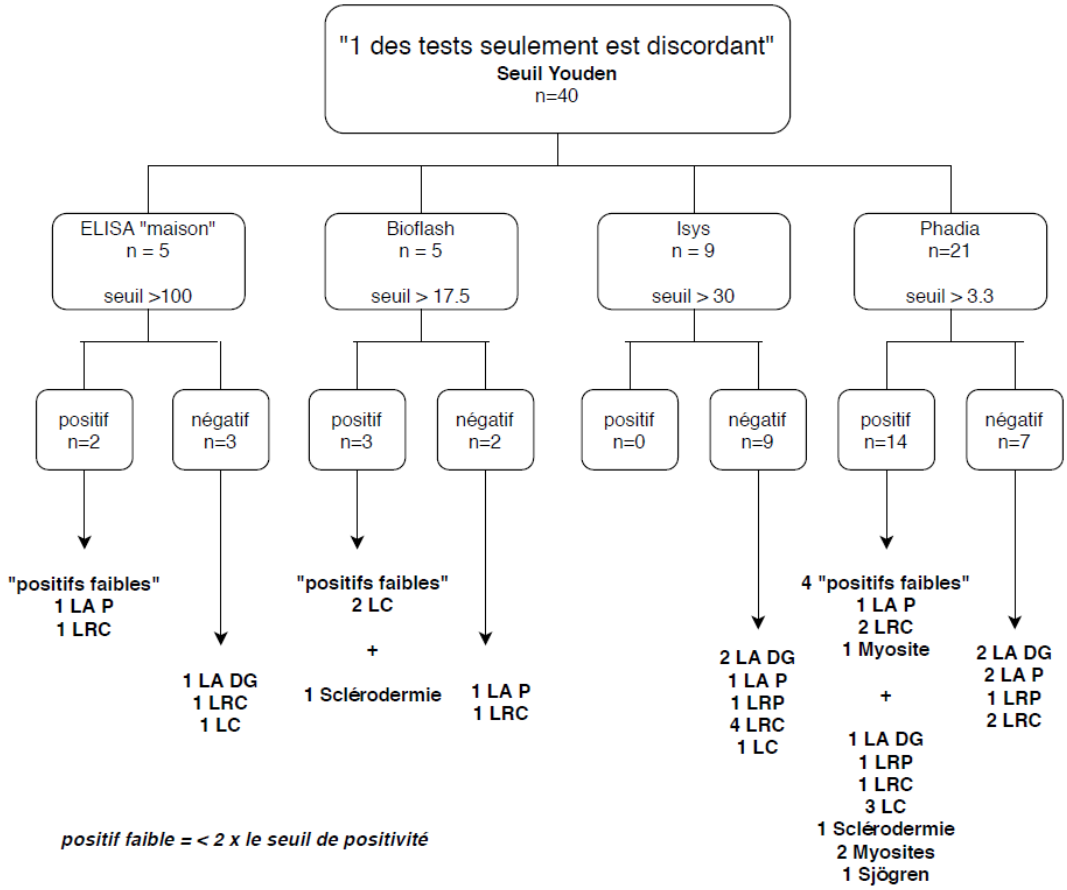


Figure 22 - Répartition des résultats discordants d'une seule technique lorsque les trois autres sont concordantes

3.10.2 Analyse des résultats 50% discordants

Pour les 16 discordances où 50% des tests rendaient autant « positif » que « négatif » nous avons souhaité reprendre les dossiers tant au niveau biologique que clinique. Nous avons demandé à un clinicien de revoir les dossiers de chacun de ces patients, et de nous dire les résultats qu'il aurait attendus. Les résultats sont présentés dans le Tableau 30.

Au total, l'analyse des discordances donne la bonne interprétation dans 10 cas sur 16 (62.5%) pour l'ELISA « maison » et l'iSYS, dans 7 cas sur 16 (43.5%) pour le Bioflash et dans 5 cas sur 16 (31.3%) pour le Phadia. Si l'on reprend le nombre de fois où chaque test est discordant 3/4 ou 2/4, on obtient les résultats indiqués dans le Tableau 31.

Tableau 30 - Interprétation clinique des résultats discordants

Clinique	Interprétation seuil Y				En nombre de fois le seuil Y				Aspect des AAN	Résultat "probable" pour le clinicien après sa revue des dossiers	Arguments apportés par le clinicien
	Elisa Maison	Bioflash	Isys	Phadia	Elisa Maison	Bioflash	Isys	Phadia			
	100	17,5	30	3,3							
LA	P	P	N	N	2,5	2,2			1280 HM C-	Positif	Forte positivité des AAN, absence de traitement
LA	P	P	N	N	2,5	1,5			1280 M C+	Positif	Pas de signe de poussée, aspect en IFI, absence de traitement
LI	P	N	P	N	1,4		4,4		1280 HM C+	Positif	Caractère lupus-induit de l'anti-TNF incertain, aspect des AAN
LA	P	N	N	P	2	0,9		2,7	640 M C-	Positif	Poussée de néphrite lupique
LA	P	N	N	P	1,4			1,0	640 H C+	Positif	Poussée articulaire, aspect des AAN, absence de traitement
LRP	P	N	N	P	2,4	0,8		2,3	1280 M C-	Positif	Quelques douleurs articulaires persistantes
LC	P	P	N	N	1	1,6			1280 M C?	Négatif	Lupus cutané chronique sans autre atteinte
LRC	P	N	P	N	6,5		1,2		160 M C-	Négatif	Rémission clinique, aspect en IFI, traitement immunosuppresseur
LC	P	N	N	P	1			1,3	160 HM C-	Négatif	Lupus cutané chronique sans autre atteinte
LRC	P	N	N	P	2			3,2	320 M C-	Négatif	Aspect moucheté faible en IFI, rémission clinique, traitement par MTX
LRC	P	N	N	P	1,6			2,8	1280 H C+	Négatif	Rémission clinique, traitement immunosuppresseur
LRC	P	N	N	P	2,5			1,3	1280 M C-	Négatif	Rémission clinique
LRC	N	P	N	P		1,2		2,9	1280 HMN C+	Négatif	Forte positivité des AAN mais lupus cutané chronique
LRC	N	P	N	P		1,5		7,0	320 M C-	Négatif	Rémission clinique, traitement immunosuppresseur
LRC	N	P	N	P		1,0		1,7	320 HM C-	Négatif	Rémission clinique, traitement immunosuppresseur
LRP	N	P	N	P		1,2		3,4	160 H C?	Négatif	Aspect des AAN, traitement immunosuppresseur

Les lettres en rouges correspondent aux résultats « probables » attendus par le clinicien ; les chiffres en rouges correspondent aux positifs supérieurs ou égaux à 2 fois le seuil de positivité.

Tableau 31 - Nombre de discordances des tests selon les critères définis et taux de discordance global

	ELISA « maison »	Bioflash	iSYS	Phadia
4/4	0	0	0	0
3/4	5	5	9	21
2/4	6	9	6	11
Total de discordants	11	14	15	32
Taux de discordance global	**6.8%**	**8.6%**	**9.3%**	**19.8%**

Parmi l'ensemble des dossiers analysés, l'ELISA « maison » est le test dont le taux de discordance est le plus bas, suivi de près par le Bioflash et l'iSYS. Le Phadia est quant à lui discordant dans près d'un cas sur cinq.

4. Discussion

4.1 Interprétation des résultats

Dans cette étude, nous avons montré que les taux médians d'Ac IgG anti-ADNn sont cohérents avec la clinique pour chacun des fournisseurs : ils sont plus élevés en poussée qu'en rémission, et sont inférieurs au seuil pour les LC et chez les patients non LES.

4.1.1 Hétérogénéité des résultats

Les standards WO/80, et désormais 15/174, ont été adoptés par de nombreux fournisseurs, et les tests quantitatifs récents, comme ceux étudiés ici du Bioflash, de l'iSYS et du Phadia, ont été calibrés par rapport à ces derniers. Ces standards obtenus de sérums d'un seul patient correspondent à une réponse polyclonale, qui peut être très variable d'un patient à l'autre. Or, il existe une grande hétérogénéité des auto-Ac, en termes de classes, sous-classes et variété des épitopes reconnus. Par ailleurs, tous les tests diffèrent en termes de méthodes de dosage, de sources d'Ag, de supports solides sur lequel l'Ag est fixé et donc de nombre de sites antigéniques disponibles, de composition de tampon, des types et spécificités des conjugués utilisés, de temps d'incubation...[132,133] Par conséquent, ces différents tests ne détectent pas exactement les mêmes Ac, ni avec la même efficacité, y compris au sein du standard utilisé. Tout cela conduit à des performances différentes.

Mummert *et al.*[85] résument le principe des différences de dosage (Figure 23). Chaque test est calibré selon le standard OMS. Si on considère qu'il existe trois types (bleu, rouge et vert) d'Ac anti-ADNn, le standard OMS définit des unités à 200 UI/mL dans un mélange donné. Le test 1 détecte le type bleu et le test 2 le type rouge. Ainsi, pour le test 1, deux Ac bleus correspondent à 200 UI/mL ; pour le test 2, six Ac rouges correspondent à 200 UI/mL.

Si on prend le sérum d'un patient qui contiendrait ces trois type d'Ac, mais dans des proportions différentes, le test 1 va détecter 6 Ac bleus, et donc rendre un résultat à 600 UI/mL, alors que le test 2 va détecter 3 Ac rouge et donc rendre un résultat à 100 UI/mL.

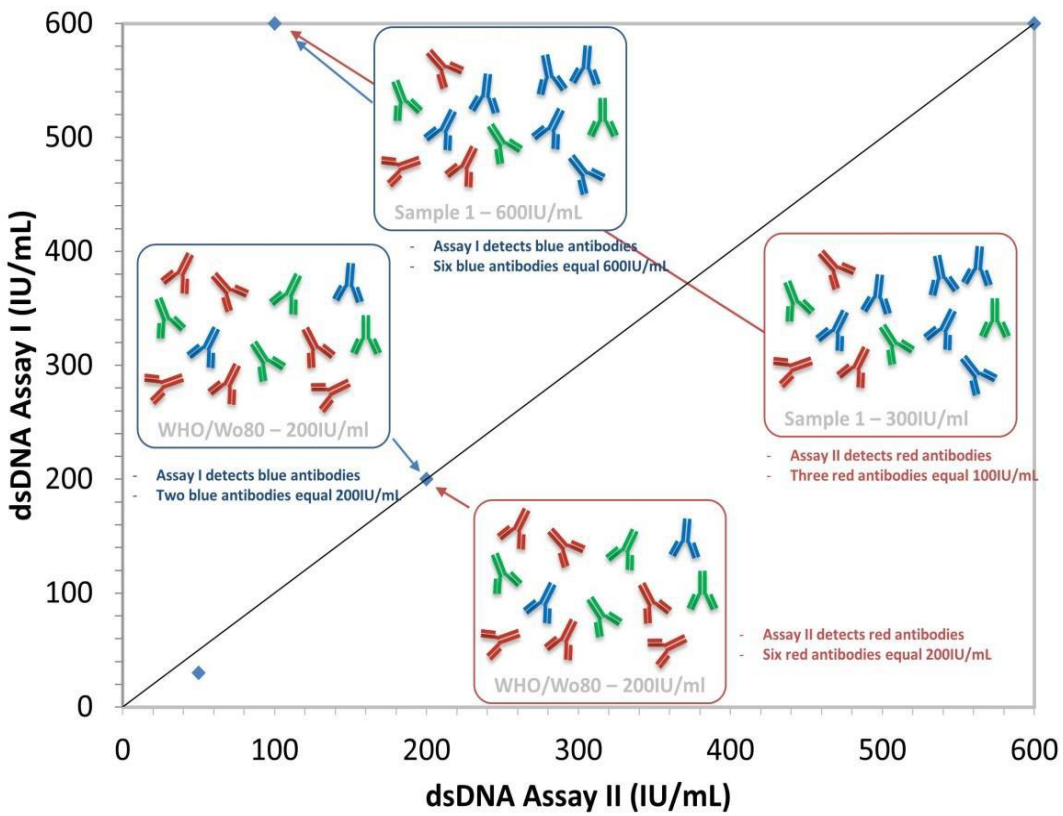


Figure 23 - Corrélation de dosages d'Ac anti-ADNn entre deux techniques, sur trois sous-populations différentes (d'après Mummert et al.[85])

Cela implique que le sérum d'un patient, qu'il soit composé d'Ac différents de ceux du standard OMS, ou des mêmes anticorps mais dans des proportions différentes, peut donner des résultats différents selon les techniques. Enfin, la variabilité des sources d'Ag choisie peut également avoir un impact sur le dosage. Tout cela expliquerait les discordances des résultats selon les techniques.

Concernant les dossiers discordants revus par un clinicien (Tableau 30), l'ensemble des dossiers étiquettés LA étaient attendus « positifs » et l'ensemble des dossiers LRC étaient attendus « négatifs ». Pour autant, il existe des résultats biologiques « discordants » de la clinique quel que soit le test. Ainsi, l'examen clinique doit rester prééminent par rapport aux dosages des Ac anti-ADNn, ces derniers n'étant qu'un élément apportant une aide au diagnostic, au suivi et à la prédiction des poussées de la maladie (deux points dans le score d'activité SLEDAI).

4.1.2 Comparaison des automates

4.1.2.1 Dosages CLIA sur les automates Bioflash et iSYS

L'évaluation de ces deux automates utilisant la chimiluminescence a montré de bonnes performances. L'utilisation de l'index de Youden sur le Bioflash a permis de diminuer le nombre de faux négatifs et d'augmenter les performances, qui sont alors très proches de l'ELISA « maison ». Pour l'iSYS, il a permis de montrer que les valeurs « équivoques » de 30 à 50 UI/L selon la notice fournisseur seraient à interpréter comme « positives » pour notre cohorte. Elle serait cependant moins sensible que l'ELISA « maison » et le Bioflash, même si cette différence n'est pas statistiquement significative.

D'un point de vue pratique, l'iSYS a une capacité d'échantillons à bord plus élevée. La distribution des échantillons se faisant sur des racks (10 racks de 12 places), il est possible de facilement les retirer une fois le rack prélevé. Cependant, la dilution automatique des échantillons n'est pas possible. Le Bioflash ne peut accueillir que 30 échantillons à la fois dans un carrousel peu pratique d'usage qu'il n'est possible de décharger qu'une fois la totalité des échantillons traités. Cela peut être limitant en pratique quotidienne, d'autant plus si d'autres marqueurs viennent à être dosés sur cet automate.

4.1.2.2 Dosage Elia sur l'automate Phadia

Plusieurs arguments sont en défaveur de l'automate Phadia pour détection des Ac anti-ADNn par fluorimétrie (Elia) : il est moins corrélé aux autres techniques ; il est le moins performant bien que l'utilisation du seuil Y augmente la sensibilité du test de manière significative en réduisant le nombre de faux négatifs, c'est au détriment d'une perte de spécificité ; et le taux de discordance global est le moins bon puisque près d'un dosage sur cinq n'a pas répondu aux critères que nous avions fixés dans cette étude.

Il faut cependant noter que nous avons analysé plusieurs échantillons lipémiques et hémolysés sur le Phadia là où le fournisseur ne l'avait pas recommandé, mais ces échantillons ne sont pas rares en pratique courante.

Au total, les deux automates CLIA ont des performances non significativement différentes de la technique maison.

4.2 Comparaison avec les données de la littérature

Le choix des cohortes de patients pour la validation d'un test influence fortement la détermination du seuil choisi et sa performance finale. Dans notre étude, nous avons choisi de valider nos résultats par rapport à leur capacité de faciliter le diagnostic de LA, en l'absence de traitement, ce dernier étant susceptible d'influer sur le taux des Ac anti-ADNn. Les résultats obtenus pour ce sous-groupe de lupus ont été comparés à ceux obtenus pour les contrôles « connectivites non lupiques », considérés comme contrôles négatifs. Les autres sous-groupes cliniques de lupus tels que les LR ou les LC, n'ont pas servi aux études de performance des techniques, mais sont seulement analysées au niveau des concordances ou discordances de résultats entre celles-ci. Devant un tableau clinique évocateur de lupus, l'intérêt de la mise en évidence des Ac anti-ADNn sera donc d'orienter vers un lupus aigu ou en poussée et d'écarter une autre connectivite. A l'inverse, un résultat négatif écartera un lupus aigu ou en poussée, mais pas une forme moins aigue, une rémission de cette maladie, ou un lupus cutané. Ce sont les autres éléments cliniques ou biologiques du bilan qui permettront de conclure. Ainsi, un taux d'Ac anti-ADNn ne peut s'interpréter de façon isolée.

Nous avons comparé nos résultats à ceux de la littérature (Tableau 32) qui incluent d'autres techniques comme le Farr, l'ALBIA, les CLIFT, et des ELISA commerciaux. La plupart des études se réfèrent au test de Farr qui a longtemps été la technique de référence de dosage des Ac anti-ADNn.

Dans leur étude, Launay *et al.*[134] ont montré que l'Elia avait d'aussi bonnes performances que le test de Farr en comparant 99 LA à des donneurs de sang d'une part (AUC = 0.95), et à des malades atteints d'autres connectivites d'autre part (AUC = 0.91). Leeuw *et al.*[135] ont montré que le test de Farr avait une moins bonne spécificité que l'Elia. Cependant, le groupe contrôle étudié comportait entre autre des « lupus incomplets, des MCTD, et des connectivites indifférenciées (UCTD) qui ont pu détériorer ces performances. La nature du groupe contrôle choisi peut donc avoir une influence majeure sur les performances d'un test. L'Elia était cependant moins performant pour l'évaluation de la sensibilité du groupe LR comparativement au groupe LA (41%), alors que le test de Farr gardait une bonne sensibilité (95%). Fiegel *et al.*[136] ont également montré qu'avec un seuil calculé avec l'index de Youden, les performances évaluées globalement de l'Elia étaient plus élevées que celles du Farr.

Infantino *et al.*[96] ont comparé 4 techniques de dosage des Ac anti-ADNn dont le Bioflash qui, comme dans notre étude, obtient de meilleures performances avec un seuil recalculé à partir de l'index de Youden maximal. Même si sa sensibilité reste faible dans cette cohorte, elle est la meilleure parmi les 4 techniques comparées et les patient lupiques inclus n'ont pas été détaillés. Les performances du Bioflash sont comparables à celle d'un ELISA commercial dans l'étude multicentrique menée par Bentow *et al.*[137] sur 843 patients lupiques, qui ont considéré comme positifs tous les patients de la zone « douteuse » du fournisseur sans recalculer les seuils.

Gonzalez *et al.*[138] ont comparé le Zennit (équivalent à l'iSYS, certificat d'équivalence vérifié) au test de Farr et à un ELISA commercial sur 844 demandes de dosage arrivées dans leur laboratoire durant trois mois. Au total, seul 26 ont été étiquetés LES. Les performances du Zennit étaient très bonnes avec une meilleure sensibilité que le test de Farr testé (81% contre 69%) et une spécificité de 96%. Ces résultats sont comparables avec les résultats que nous avons obtenus.

Les études qui ont comparé le Bioplex[96,139,140] à d'autres techniques ont déterminé de moins bonnes performances notamment en terme de sensibilité, même si la spécificité reste correcte.

Celles qui ont utilisé le CLIFT[96,134,140] ont pour la plupart trouvé comme attendu des sensibilités médiocres qui varient fortement d'un fournisseur à l'autre (8,2% à 29,4% dans les études citées). Mais leur intérêt réside dans leur forte spécificité.

Les seuils recalculés grâce à l'index de Youden dans les publications citées sont globalement plus élevés que ceux de cette étude et sont généralement plus élevés que les seuils fournisseur. Cela tient au fait que la plupart d'entre elles ne séparent pas les LA des LR dans le calcul des performances. Les LR peuvent ne plus avoir d'Ac anti-ADN natif, mais ils sont comptés comme LES, ce qui augmente le nombre de faux négatifs et le calcul de la sensibilité se voit alors altéré. Nos spécificités sont également très bonnes car elles ont été calculées à partir d'une cohorte de patients non lupiques atteinte de connectivites « pures ». Nous avons exclu tous les malades présentant des phénotypes de MCTD ou UCTD, ce qui nous a permis d'éviter au maximum les faux positifs. Si, comme dans la plupart des publications, nous avions calculé nos performances sur la base LES *vs* non LES, en incluant les LC et les résultats « douteux » comme « positifs » dans le groupe LES, les sensibilités auraient été de

76% pour l'ELISA « maison », de 63% pour le Bioflash, de 62% pour l'iSYS et de 52% pour le Phadia (seuils F).

On comprend donc qu'il est très difficile de comparer entre elles les études sur les dosages des Ac anti-ADNn. Sur le plan de la comparaison technique, pour un même principe de dosage, les différents fournisseurs peuvent utiliser des réactifs différents, expliquant l'hétérogénéité des résultats. Par ailleurs, sur le plan méthodologique, les cohortes de patients étudiées diffèrent selon les études, les traitements ainsi que l'état clinique des patients perturbant les taux d'Ac anti-ADNn.

4.1Avantages du changement de technique

4.1.1 Maintien d'un dosage de qualité

Les résultats de cette étude montrent que, même si leurs performances peuvent être significativement différentes, aucune des 3 techniques n'était totalement déficiente. Selon la nouvelle classification EULAR 2019, la spécificité du test de dosage des Ac anti-ADNn doit être supérieure à 90%. Dans notre étude, parmi les 3 automates testés, seuls le Bioflash et l'iSYS répondent à cette exigence. La mise en place depuis quelques années de procédures rigoureuses de contrôle de la qualité, et l'usage régulier de contrôles de qualité externes (EEQ), semble avoir produit de véritables gains dans ce domaine, y compris pour les techniques commerciales.

Nous avons également montré l'utilité de tester ces techniques sur des cohortes de patients bien définies, afin de choisir les seuils de façon optimale. Ainsi, les seuils (Y), recalculés grâce aux courbes ROC, nous ont permis d'optimiser les performances de ces tests. Les performances des tests ne diffèrent pas significativement et celles des deux techniques CLIA sont proches.

Nous avions également l'intention de comparer les résultats d'une technique ELISA commerciale à l'aide d'un automate de dilution (DS2). Mais les dosages, effectués par une technique insuffisamment maitrisée, et limités par les quantités de sérum disponibles, n'ont pu être utilisés.

Tableau 32 - Performance des tests pour le dosage des Ac anti-ADNn recensés dans la littérature. En vert les techniques comparées dans cette étude.

Cohorte	Technique	Automate	Fabricant	Seuil	Se (%)	Spé (%)	AUC	Article
99 LA vs 101 DS	Farr	/	Trinity Biotech	F 7	79,8	98	0,93	2010, Launay et al
	Elia	Phadia	Pharmacia	F 15	66,3	95	0,95	
	CLIFT	/	Diasorin	/	16,8	100	0,58	
99 LA vs 54 CT	Farr	/	Trinity Biotech	F 7	79,8	79,2	0,89	
				Y 7,3	75,8	95		
	Elia	Phadia	Pharmacia	F 15	66,3	94,3	0,91	
				Y 17	62,1	95		
	CLIFT	/	Diasorin	/	16,8	100	0,58	
50 LES dont 22 NL vs 59 CT (dont 20 DS)	Farr	/	Trinity Biotech	Y 2,4			0,77	2010, Fiegel et al
	Elia	Phadia	Thermofisher	Y 6,4			0,89	
	ELISA "Farrzyme"	/	The Binding Site	Y 11,1			0,88	
105 LES vs DS (n=60)	Farr	/	Trinity Biotech	Y 10	62.2	82.6	0.76	2013, Venner et al
	ELISA "Farrzyme"	/	Inova Diagnostics	Y 16	71.1	76.1	0.73	
	ALBIA	Bioplex	Biorad	Y 10	57.8	80.4	0.74	
61 LES vs 100 CT (dont 20 DS)	Clia	Bioflash	Inova Diagnostics	F 35	39,3	96	0,79	2015, Infantino et al
				Y 27,5	52,5	94		
	ELISA "Farrzyme"	/	Inova Diagnostics	F 30	54,1	91	0,90	
				Y 49,6	45,9	94		
	ALBIA	Bioplex	Biorad	F 5	44,3	88	0,68	
				Y 12	21,3	94		
	CLIFT	/	Inova Diagnostics	/	8,2	100	0,54	
26 LES, 618 non LES	Farr	/	IBL	F 7	69	96		2015, Gonzalez et al
	ELISA	/	Sacramento	F 50	35	99		
	CLIA	Zennit	Menarini	F 30	81	96		
843 LES vs 588 CT (multicentrique)	ELISA (566 LES)	/	Inova Diagnostics	F 30	52.3	NC		2016, Bentow et al
	CLIA (843 LES)	Bioflash	Inova Diagnostics	F 27	54.3	89.8		
40 LA vs 214 CT	Farr	/	Siemens	NC	93	53		2017, Leeuw et al
	Elia	Phadia	Thermofisher	NC	95	91		
152 LR vs 214 CT	Farr	/	Siemens	NC	95	53		
	Elia	Phadia	Thermofisher	NC	41	91		
119 LES, 100 CT, 200 DS	Farr	/	Beijing North Institute	F 7	86.5	55.7		2018, Zhao et al
				Y 17.5	81.7	61		
	ALBIA	Bioplex	Biorad	F 10	69.7	86.7		
				Y 12.5	63	90		
	CLIA	NC	HOB Biotech Group	F 10	86.6	70.7		
				Y 12.5	77.3	75.1		
	CLIFT	/	Euroimmun	/	29.4	99		

4.1.2 Gestion de la qualité assouplie

Le passage en test automatisé devrait limiter la variabilité intra et inter-opérateur, mais cela devra être vérifié à l'aide d'études de répétabilité et reproductibilité qui seront effectuées à l'installation de l'automate choisi.

Un important gain supplémentaire sera est lié à la conservation et stabilité des réactifs à bord des automates qui, de plus, gèrent les caractéristiques de ces réactifs (lots, calibration, dates de péremption).

4.1.3 Passage à des tests unitaires et délai de rendu

Le travail en série et la gamme de mesure en technique « maison » peu étendue, font que la quantification des taux élevés d'Ac doit être reportée à la série suivante, ce qui retarde la transmission finale des résultats surtout lorsque les contraintes organisationnelles limitent le nombre de techniques hebdomadaires réalisées.

Les automates testés dans cette étude ont des temps de dosages raccourcis et optimisés permettant plusieurs dizaines de tests par jour. Le mode d'analyse et leur principe permettent des dosages dits « unitaires » qui n'imposent pas un nombre d'échantillon fixe par série. Seul les passages de contrôles en début et fin de série, peuvent avoir un impact sur le coût des dosages selon la fréquence de celles-ci.

Cette souplesse ainsi que la capacité des automates à diluer de manière automatique les échantillons à taux élevé d'Ac anti-ADNn permettra d'améliorer nettement les délais de rendu des résultats, et nous mettra en capacité d'augmenter facilement le nombre de dosages dans le contexte du Groupement Hospitalier de Territoire (GHT).

4.1.4 Autres tests simultanés

Des tests doivent également être faits pour d'autres dosages d'auto-Ac, tels que les ENA, les Ac anti-cardiolipine ou –B2GP1, les FRM… S'ils sont choisis sur le même automate, ils pourront très facilement être faits simultanément sur les mêmes échantillons, simplifiant d'autant l'organisation du laboratoire en autoimmunité. Ils devront toutefois, comme les Ac anti-ADNn faire l'objet de comparaisons techniques préalables.

4.2 Inconvénients attendus du changement de technique

4.2.1 Système fermé

L'une des contraintes d'une technique automatisée est que le dosage peut n'être adapté qu'à certaines types d'échantillons biologiques. Ce n'est pas un inconvénient pour les Ac anti-ADNn car leur recherche n'est que sérique, mais certains auto-Ac peuvent être recherchés dans des matrices particulières comme le liquide céphalorachidien.

Les réactifs utilisés peuvent ne pas être clairement décrits dans les notices des fabricants. Il faut cependant obtenir la maitrise technique en demandant au fournisseur de communiquer suffisamment sur leur évolution. Cela rend encore plus crucial, la nécessité d'un regard critique sur la pertinence des dosages, en confrontant les résultats obtenus aux résultats précédents des mêmes patients, et aux autres éléments cliniques et/ou biologiques de leur suivi. Dans ce contexte, l'utilisation d'un EEQ, voire de CQI indépendants du fournisseur du dosage, devient essentielle.

4.2.2 Coût

Le coût unitaire des analyses effectuées par ces systèmes automatisés est plus élevé que celui de la technique ELISA « maison », ou même des ELISA commerciaux, mais intègrent les frais d'installation, de formation, les contrats de maintenance avec dépannage rapide du fait de l'absence d'appareil en « back up » en auto-immunité. La technique de Farr, très utilisée précédemment, est également coûteuse et beaucoup moins pratique. Le gain organisationnel pour le laboratoire et la possibilité d'effectuer plus de dosages dans le cadre du GHT compenseront en partie cette augmentation.

Il est fréquent que des laboratoires utilisent une 2ème technique de dosage pour contrôler des résultats incertains ou surprenants[98]. Cela impose cependant l'accréditation de celle-ci et ajoute des coûts à ceux des techniques automatisées, déjà élevés.

4.2.3 Arrêt du dosage des anticorps anti-ADN dénaturé

Dans ce contexte précis, nous ne pourrons plus effectuer le dosage des Ac anti-ADNd, que nous réalisions systématiquement, en parallèle des Ac anti-ADNn. Le suivi des patients montre que les sérums de patients lupiques, même en phase de rémission ou dans des formes peu actives, contenaient presque toujours des taux élevés d'Ac anti-ADNd (supérieurs à cinq

fois le seuil), une négativation étant possible sous immunosuppresseurs. Ils ne sont pas spécifiques du lupus, car fréquemment présents dans les autres connectivites, mais à des taux significativement diminués par rapport aux lupus. Les résultats de ces dosages pour notre cohorte confirment ces observations.

L'expérience du laboratoire est qu'ils sont fréquemment élevés isolément dans les lupus cliniquement moins sévères, comme ceux de symptomatologie cutanéo-articulaire, ou pauci-symptomatiques. Leur recherche peut également être utile pour le diagnostic des lupus induits par les médicaments, pour lesquels les Ac anti-ADNn n'apparaissent pas, ou seulement très tardivement dans leur évolution. Il sera plus difficile d'identifier d'éventuels lupus peu ou pas encore actifs, sans Ac anti-ADNn, parmi des patients dont les taux et aspect des AAN peuvent être très variables. Ce ne sont *a priori* pas des lupus de mauvais pronostic, mais cette non détection risque de retarder la mise en place de surveillance spécifique et l'identification précoce d'une poussée évolutive plus sévère.

4.3 Limites de l'étude

Les patients présentant une atteinte rénale au diagnostic sont surreprésentés dans notre étude, comparativement à la littérature. Il s'agit d'un biais de sélection puisqu'une partie non négligeable des patients a été sélectionné par le service de néphrologie. Les performances du test retenu seront donc à valider en prospectif à la mise en place de la technique, avec un plus grand nombre de patients inclus au diagnostic et des donneurs sains comme population contrôle.

Le faible volume d'échantillons, ainsi que le volume mort nécessaire aux dosages, n'ont pas permis d'aliquoter les échantillons. Ainsi, l'ensemble des dosages a imposé des cycles répétés de congélation-décongélation. Bien que nous ayons veillé à travailler le plus souvent à +4° et à laisser les échantillons le moins possible à température ambiante, le Phadia, qui a été le dernier automate testé, pourrait en avoir des performances dégradées. Refaire le dosage des Ac anti-ADNn en ELISA « maison » sur le reliquat pourrait être intéressant pour évaluer cet impact.

Les indices d'ictère, d'hémolyse et de lipémie n'ont pas été relevés. Certains automates avaient fourni la preuve que ces indices n'avaient pas d'impact jusqu'à une certaine concentration, mais la notice du test Phadia recommandait de ne pas doser de tels

échantillons. Cela aurait également pu dégrader les performances de ce test, mais il semble difficile de refuser de tels échantillons en pratique courante.

Enfin, nous n'avons pas eu accès à la technologie Luminex qui nous auraient permis de comparer une autre technique de dosage.

5. Conclusion

Pour sélectionner une méthode, on ne peut pas s'appuyer uniquement sur les performances déterminées dans la littérature. Il est nécessaire de vérifier les performances des tests avant de leur mise en routine.

Tous les automates testés permettent des dosages unitaires des Ac anti-ADN natif, avec un délai de rendu plus rapide que la technique ELISA « maison ». Des gains importants sont attendus en termes de praticité et de traçabilité, sans dégradation significative des performances du dosage par rapport à celle-ci.

Au total, nous avons montré que les techniques de chimiluminescence du Bioflash et de l'iSYS ont mieux répondu à nos critères que la technique Elia du Phadia.

Au regard des offres techniques des automates, le choix s'est orienté sur le Bioflash dont les performances ont également été évaluées pour les Ac anti-antigènes solubles et les Ac anti-phospholipides.

Bibliographie

1. Rahman, A. Systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* 11 (2008).
2. Stojan, G. & Petri, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: an update. *Current Opinion in Rheumatology* **30**, 144–150 (2018).
3. Pons-Estel, G. J., Ugarte-Gil, M. F. & Alarcón, G. S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Expert Review of Clinical Immunology* **13**, 799–814 (2017).
4. Deng, Y. & Tsao, B. P. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 683–692 (2010).
5. Criswell, L. A. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. **66**, 176–83 (2008).
6. Manderson, A. P., Botto, M. & Walport, M. J. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 431–456 (2004).
7. Moser, K. L., Kelly, J. A., Lessard, C. J. & Harley, J. B. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* **10**, 373–379 (2009).
8. Graham, R. R., Hom, G., Ortmann, W. & Behrens, T. W. Review of recent genome-wide association scans in lupus. *Journal of Internal Medicine* **265**, 680–688 (2009).
9. Rasmussen, A. *et al.* The lupus family registry and repository. *Rheumatology* **50**, 47–59 (2011).
10. Geara, A. S. Lupus Cerebritis After Visiting a Tanning Salon. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* **67**, 391–3 (2009).
11. Arnson, Y., Shoenfeld, Y. & Amital, H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* **34**, J258–J265 (2010).
12. Formica, M. K., Palmer, J. R., Rosenberg, L. & McAlindon, T. E. Smoking, alcohol consumption, and risk of systemic lupus erythematosus in the Black Women's Health Study. *J Rheumatol* **30**, 1222–1226 (2003).
13. Costenbader, K. H. *et al.* Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Arthritis & Rheumatism* **50**, 849–857 (2004).

14. Rubin, R. L. *et al.* Effect of cigarette smoke on autoimmunity in murine and human systemic lupus erythematosus. *Toxicological Sciences* **87**, 86–96 (2005).
15. Finckh, A. *et al.* Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis Rheum* **54**, 3648–3654 (2006).
16. Ramos-Casals, M. *et al.* Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature. *Medicine* **87**, 311–318 (2008).
17. Parks, C. G. *et al.* Association of Epstein-Barr virus with systemic lupus erythematosus: Effect modification by race, age, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 genotype. *Arthritis Rheum* **52**, 1148–1159 (2005).
18. McClain, M. T. *et al.* Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* **11**, 85–89 (2005).
19. Rubin et al. Drug-induced lupus. *Toxicology* **209**, 135–147 (2005).
20. Abuaf, N., Rozen, J. & Rajoely, B. Intolérance médicamenteuse et autoanticorps. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **42**, 35–44 (2002).
21. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**, 495–516 (2007).
22. Herrmann & al., M. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **41**, 1241–50 (1998).
23. Baumann, I. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **46**, 191–201 (2002).
24. Shao, W.-H. & Cohen, P. L. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* **13**, 202–209 (2010).
25. Kaul, A. *et al.* Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 16039 (2016).
26. Kammer, G. M., Perl, A., Richardson, B. C. & Tsokos, G. C. Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **46**, 1139–1154 (2002).

27. Blanco, P., Pellegrin, J.-L., Moreau, J.-F. & Viallard, J.-F. Physiopathologie du lupus érythémateux systémique. *La Presse Médicale* **36**, 825–834 (2007).
28. Mathian, A., Arnaud, L. & Amoura, Z. Physiopathologie du lupus systémique : le point en 2014. *La Revue de Médecine Interne* **35**, 503–511 (2014).
29. Doreau, A. *et al.* Interleukin 17 acts in synergy with B cell–activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* **10**, 778–785 (2009).
30. Basten, A. & Silveira, P. A. B-cell tolerance: mechanisms and implications. *Current Opinion in Immunology* **22**, 566–574 (2010).
31. Shlomchik, M. J. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* **28**, 18–28 (2008).
32. Mackay, M. *et al.* Selective dysregulation of the FcγIIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* **203**, 2157–2164 (2006).
33. Flores-Borja, F., Kabouridis, P. S., Jury, E. C., Isenberg, D. A. & Mageed, R. A. Altered lipid raft–associated proximal signaling and translocation of CD45 tyrosine phosphatase in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **56**, 291–302 (2007).
34. Ettinger, R. *et al.* IL-21 and BAFF/Blys synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* **178**, 2872–2882 (2007).
35. Petri, M. *et al.* Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **58**, 2453–2459 (2008).
36. Siegal et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human Blood. *Science* **284**, 1835–1837 (1999).
37. Banchereau, J. & Pascual, V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* **25**, 383–392 (2006).

38. Richez, C., Blanco, P., Rifkin, I., Moreau, J.-F. & Schaeverbeke, T. Role for toll-like receptors in autoimmune disease: The example of systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* **78**, 124–130 (2011).

39. Piers, W., Béatrice, D., Daniel, Z. & Armand, B. Traitement antiviral, pour ou contre l'interféron de type I. *Med Sci (Paris)* **29**, 836–839 (2013).

40. Berghöfer, B. *et al.* TLR7 Ligands induce higher IFN-α production in females. *J Immunol* **177**, 2088–2096 (2006).

41. Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6**, 823–835 (2006).

42. Bennett, L. *et al.* Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus Blood. *J Exp Med* **197**, 711–723 (2003).

43. Ma, C. *et al.* Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN-alpha and TNF-alpha in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* **32**, 395–402 (2012).

44. Yeh, T.-M., Chang, H.-C., Liang, C.-C., Wu, J.-J. & Liu, M.-F. Deoxyribonuclease-Inhibitory antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* **10**, 544–551 (2003).

45. Pieterse, E. & van der Vlag, J. Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* **5**, 1–8 (2014).

46. Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A. & Herrmann, M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* **6**, 280–289 (2010).

47. Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**, 619–630 (2010).

48. Lande, R. *et al.* Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine* **3**, 1–20 (2011).

49. Fenton, K. The effect of cell death in the initiation of lupus nephritis: Cell death and lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* **179**, 11–16 (2015).

50. Blanco, P. *et al.* Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **52**, 201–211 (2005).
51. Gatto, M. *et al.* Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. *Autoimmunity Reviews* **12**, 523–536 (2013).
52. Kowal, C. *et al.* Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *PNAS* **103**, 19854–59 (2006).
53. Buyon, J. P. & Clancy, R. M. Maternal autoantibodies and congenital heart block: mediators, markers, and therapeutic approach. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **33**, 140–154 (2003).
54. Ruiz-Irastorza, G. Systemic lupus erythematosus, The Lancet, Vol 357. (2001).
55. Cervera, R. *et al.* Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine* **82**, 299–308 (2003).
56. Cervera, R., Khamashta, M. & Hughes, G. The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus* **18**, 869–874 (2009).
57. Mckinley, P. S., Ouellette, S. C. & Winkel, G. H. The contributions of disease activity, sleep patterns, and depression to fatigue in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **38**, 826–834 (1995).
58. Jump, R. L. *et al.* Fatigue in systemic lupus erythematosus: contributions of disease activity, pain, depression, and perceived social support. *The Journal of Rheumatology* **32**, 1699–1705 (2005).
59. Amoura, Z. Protocole national de diagnostic et de soins (PNDS), Lupus systémique. **mise à jour 2019**, (2017).
60. Budhram, A. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibody as a marker of erosive arthritis in patients with systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Lupus* **23**, 1156–1163 (2014).

61. Almehed, K., Forsblad d'Elia, H., Kvist, G., Ohlsson, C. & Carlsten, H. Prevalence and risk factors of osteoporosis in female SLE patients--extended report. *Rheumatology* **46**, 1185–1190 (2007).
62. Becker, A., Fischer, R., Scherbaum, W. A. & Schneider, M. Osteoporosis screening in systemic lupus erythematosus: impact of disease duration and organ damage. *Lupus* **10**, 809–814 (2001).
63. Ruiz-Irastorza, G., Egurbide, M. V., Olivares, N., Martinez-Berriotxoa, A. & Aguirre, C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology* **47**, 920–923 (2008).
64. Karras, A. & Martinez, F. Rein et lupus : données récentes. *Revue du Rhumatisme* **72**, 162–167 (2005).
65. Weening, J. J. *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney International* **65**, 521–530 (2004).
66. Lupus érythémateux disséminé, Item 190 **Chapitre 12**, Nephrologie 8e édition. (2018).
67. Ramos-Casals, M. *et al.* Vasculitis in systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical characteristics in 670 patients. *Medicine* **85**, 95–104 (2006).
68. Sarabi, Z. S. *et al.* Incidence rates of arterial and venous thrombosis after diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **53**, 609–612 (2005).
69. Newman, K., Owlia, M. B., El-Hemaidi, I. & Akhtari, M. Management of immune cytopenias in patients with systemic lupus erythematosus — Old and new. *Autoimmunity Reviews* **12**, 784–791 (2013).
70. Sultan, S. M., Ioannou, Y. & Isenberg, D. A. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **38**, 917–932 (1999).
71. Swaak, A. J. G. *et al.* Systemic lupus erythematosus: clinical features in patients with a disease duration of over 10 years, first evaluation1. *Rheumatology* **38**, 953–958 (1999).
72. Memet, B. & Ginzler, E. Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. *Semin Respir Crit Care Med* **28**, 441–450 (2007).

73. Miner, J. J. & Kim, A. H. J. Cardiac manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **40**, 51–60 (2014).
74. Hanly, J. G. *et al.* Short-term outcome of neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus upon enrollment into an international inception cohort study. *Arthritis Rheum* **59**, 721–729 (2008).
75. Shoughy, S. S. & Tabbara, K. F. Ocular findings in systemic lupus erythematosus. *Saudi Journal of Ophthalmology* **30**, 117–121 (2016).
76. Shen, G. Q., Shoenfeld, Y. & Peter, J. B. Anti-DNA, antihistone, and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus and drug-induced lupus. *Clinic Rev Allerg Immunol* **16**, 321–334 (1998).
77. Jguirim, M. *et al.* Lupus érythémateux systémique induit par l'isoniazide: une complication rare à craindre. *Pan Afr Med J* **20**, 181 (2015).
78. Hochberg et al. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **40**, 1725 (1997).
79. Aringer et al. American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. **78**, 1151–1159 (2019).
80. Petri et al. Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **64**, 2677–2686 (2012).
81. Bertsias, G. K., Pamfil, C., Fanouriakis, A. & Boumpas, D. T. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: has the time come? *Nat Rev Rheumatol* **9**, 687–694 (2013).
82. Les auto-antigènes et les auto-anticorps. *accessible sur www.cri-net.com* **Chapitre 12**,.
83. Kavanaugh, A. F., Solomon, D. H. & The American College of Rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-dna antibody tests. *Arthritis & Rheumatism* **47**, 546–555 (2002).
84. Sanofi Pasteur. Histoire des anticorps anti-nucléaires, Editorial n°2 GEAI info. **2**, 1–16 (1999).

85. Mummert, E., Fritzler, M. J., Sjöwall, C., Bentow, C. & Mahler, M. The clinical utility of anti-double-stranded DNA antibodies and the challenges of their determination. *Journal of Immunological Methods* **459**, 11–19 (2018).

86. Chevailler & al. Dépistage des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires insolubles: nucléosomes, anti-adn natif et anti-histones. *Revue Francophone des Laboratoires* **384**, 51–58 (2006).

87. Koffler et al. Systemic lupus erythematosus : prototype of immune complex nephritis in man. *J Exp Med* **134**, 169–179 (1971).

88. Bootsma et al. The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation. *Ann. Rheum. Dis.* **56**, 656–661 (1997).

89. Yang et al. Combination of anti-C1q and anti-dsDNA antibodies is associated with higher renal disease activity and predicts renal prognosis of patients with lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 3552–3559 (2012).

90. Bragazzi, N. L. *et al.* Role of anti-DNA auto-antibodies as biomarkers of response to treatment in systemic lupus erythematosus patients: hypes and hopes. Insights and implications from a comprehensive review of the literature. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **19**, 969–978 (2019).

91. Monzavi, S. M. *et al.* Efficacy analysis of hydroxychloroquine therapy in systemic lupus erythematosus: a study on disease activity and immunological biomarkers. *Inflammopharmacol* **26**, 1175–1182 (2018).

92. Werle, E., Blazek, M. & Fiehn, W. The clinical significance of measuring different anti-dsDNA antibodies by asing the Farr assay, an enzyme immunoassay and a Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus* **1**, 369–377 (1992).

93. Soda, P., Onofri, L. & Iannello, G. A decision support system for Crithidia luciliae image classification. *Artificial Intelligence in Medicine* **51**, 67–74 (2011).

94. Aarden, L. A., de Groot, E. R. & Feltkamp, T. E. W. Immunology of dna Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of anti-dsDNA with the immunofluorescence technique. *Annals New York Academy of Sciences* 505–515 (1975).

95. Slater, N. G. P. & Cameron, J. S. The Crithidia luciliae kinetoplast immunofluorescence test in systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* **25**, 480–486 (1976).

96. Infantino, M. *et al.* Clinical comparison of QUANTA Flash dsDNA chemiluminescent immunoassay with four current assays for the detection of anti-dsDNA autoantibodies. *Journal of Immunology Research* **2015**, 1–8 (2015).

97. Lemarié, R. *et al.* The anti-dsDNA antibodies: Validation of an original two-step strategy of detection. *Annales de biologie clinique* **69**, 47–53 (2011).

98. Tan, E. M. & Kunkel, H. G. Pillars Article: Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* **96**, 464−471 (1966).

99. Egner, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *Journal of Clinical Pathology* **53**, 424–432 (2000).

100. Menéndez, A., Gómez, J., Escanlar, E., Caminal-Montero, L. & Mozo, L. Clinical associations of anti-SSA/Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibodies: Diagnostic utility of their separate detection. *Autoimmunity* **46**, 32–39 (2013).

101. Gómez-Puerta, J. A., Burlingame, R. W. & Cervera, R. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: Diagnostic and clinical value. *Autoimmunity Reviews* **7**, 606–611 (2008).

102. Lakomy, D. & Goetz, J. À propos des anticorps anti-PCNA. *Revue Francophone des Laboratoires* **2014**, 40–44 (2014).

103. Marto, N. Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and positive predictive value in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* **64**, 444–448 (2004).

104. Meyer, O. Anti-CRP antibodies in systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* **77**, 384–389 (2010).

105. Littlejohn, E. *et al.* The ratio of erythrocyte sedimentation rate to C-reactive protein is useful in distinguishing infection from flare in systemic lupus erythematosus patients presenting with fever. *Lupus* **27**, 1123–1129 (2018).

106. Mosca, M. *et al.* European League Against Rheumatism recommendations for monitoring patients with systemic lupus erythematosus in clinical practice and in observational studies. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**, 1269–1274 (2010).

107. Belmont, H. M. Treatment of systemic lupus erythematosus. *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases* **71**, 208–213 (2013).

108. Schrezenmeier, E. & Dörner, T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol* **16**, 155–166 (2020).

109. Jung, H. *et al.* The protective effect of antimalarial drugs on thrombovascular events in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **62**, 863–868 (2010).

110. Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P. & Khamashta, M. A. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**, 20–28 (2010).

111. Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) du Plaquenil (hydroxychloroquine), ANSM disponible ici : http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=67767535&typedoc=R.

112. Zonana-Nacach, A., Barr, S. G., Magder, L. S. & Petri, M. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. *Arthritis & Rheumatism* **43**, 1801–1808 (2000).

113. Terrier, B. *et al.* Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: Results from 136 patients from the French autoimmunity and rituximab registry. *Arthritis & Rheumatism* **62**, 2458–2466 (2010).

114. Rovin, B. H. *et al.* Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: The lupus nephritis assessment with rituximab study. *Arthritis & Rheumatism* **64**, 1215–1226 (2012).

115. Navarra, S. V. *et al.* Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **377**, 721–731 (2011).

116. Murdaca, G. *et al.* Influenza and pneumococcal vaccinations of patients with systemic lupus erythematosus: Current views upon safety and immunogenicity. *Autoimmunity Reviews* **13**, 75–84 (2014).

117. Mok, C. C., Ho, L. Y., Fong, L. S. & To, C. H. Immunogenicity and safety of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: a case–control study. *Ann Rheum Dis* **72**, 659–664 (2013).

118. Kuruma, K. A. M., Borba, E. F., Lopes, M. H., de Carvalho, J. F. & Bonfá, E. Safety and efficacy of hepatitis B vaccine in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **16**, 350–354 (2007).

119. Lehmann, P. & Homey, B. Clinic and pathophysiology of photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews* **8**, 456–461 (2009).

120. Mandal, M. *et al.* Vitamin D levels in Indian systemic lupus erythematosus patients: association with disease activity index and interferon alpha. *Arthritis Res Ther* **16**, 1–8 (2014).

121. Ghaussy, N. O., Sibbitt, W., Bankhurst, A. D. & Qualls, C. R. Cigarette smoking and disease activity in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* **30**, 1215–21 (2003).

122. Urowitz, M. B., Ibañez, D. & Gladman, D. D. Atherosclerotic vascular events in a single large lupus cohort: prevalence and risk factors. *Journal of Rheumatology* **34**, 70–75 (2007).

123. Chasset, F., Francès, C., Barete, S., Amoura, Z. & Arnaud, L. Influence of smoking on the efficacy of antimalarials in cutaneous lupus: A meta-analysis of the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology* **72**, 634–639 (2015).

124. Rousset et al. Quelle contraception pour les femmes lupiques ? *Réalités en gynécologie obstétrique* **172**, 25–26 (2014).

125. Secor R. Évaluation thérapeutique dans le lupus érythémateux systémique. *Elsevier Masson,* **Chapitre 21** 209–221 (2012).

126. Trager, J. & Ward, M. M. Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus: *Current Opinion in Rheumatology* **13**, 345–351 (2001).

127. Yurkovich, M., Vostretsova, K., Chen, W. & Aviña-Zubieta, J. A. Overall and cause-specific mortality in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis of observational studies: mortality in SLE. *Arthritis Care & Research* **66**, 608–616 (2014).

128. Goobie et al. Malignancies in systemic lupus erythematosus - a 2015 Udapte. *Curr Opin Rheumatol.* **27**, 454–460 (2015).

129. Preud'homme JL et al. Isotypic distribution of anti-double-stranded DNA antibodies: a diagnostic evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay. *Diagn Clin Immunol.* **5**, 256–261 (1988).

130. Feltkamp, T. E., Kirkwood, T. B., Maini, R. N. & Aarden, L. A. The first international standard for antibodies to double stranded DNA. *Annals of the Rheumatic Diseases* **47**, 740–746 (1988).

131. Fox, B. J. *et al.* A WHO Reference reagent for lupus (anti-dsDNA) antibodies: international collaborative study to evaluate a candidate preparation. *Ann Rheum Dis* **78**, 1677–1680 (2019).

132. Meroni, P. L. *et al.* Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 35–43 (2014).

133. Sheldon, J. & Dellavance, A strategies for building reference standards for autoantibodies. *Front. Immunol.* **6**, 1–4 (2015).

134. Launay, D. *et al.* Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and Crithidia luciliae immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta* **411**, 959–964 (2010).

135. de Leeuw, K., Bungener, L., Roozendaal, C., Bootsma, H. & Stegeman, C. A. Auto-antibodies to double-stranded DNA as biomarker in systemic lupus erythematosus: comparison of different assays during quiescent and active disease. *Rheumatology* **56**, 698–703 (2017).

136. Fiegel, F. *et al.* Autoantibodies to double-stranded DNA-Intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor-based device. *Lupus* **19**, 957–964 (2010).

137. Bentow, C. *et al.* International multi-center evaluation of a novel chemiluminescence assay for the detection of anti-dsDNA antibodies. *Lupus* **25**, 864–872 (2016).

138. González, D. A. *et al.* Anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: A combination of two quantitative methods and the ANA pattern is the most efficient strategy of detection. *Journal of Immunological Methods* **427**, 30–35 (2015).

139. Venner, A. A. *et al.* Comparison of three anti-dsDNA assays: Performance and correlation with systemic lupus erythematosus disease activity. *Clinical Biochemistry* **46**, 317–320 (2013).

140. Zhao, J. *et al.* The performance of different anti-dsDNA autoantibodies assays in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* **37**, 139–144 (2018).

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE

DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITRE

Lupus érythémateux systémique et anticorps anti-ADN natif : comparaison de méthodes entre un ELISA « maison » et des techniques automatisées

Résumé

Bien que les dosages d'anticorps anti-ADN natif soient calibrées à l'aide d'un standard international, la réponse immunitaire polyclonale, la diversité des auto-anticorps produits, et les différences intrinsèques des techniques de dosage, rendent les comparaisons difficiles entre les tests. Différents groupes de patients lupiques ont été sélectionnés et analysés, afin de prendre en compte l'hétérogénéité clinique et les différents stades de la maladie. Nous avons comparé un ELISA « maison », avec trois trousses de dosages automatisées : le CLIA d'IDS sur l'iSYS, le CLIA Quanta-Flash de Werfen sur le Bioflash et l'Elia de Thermofischer sur le Phadia (nouvellement Unicap). Les courbes ROC ont été déterminées à partir de sérums de patients lupiques au moment du diagnostic, indemnes de tout traitement et ont permis d'adapter les seuils de positivité afin de s'affranchir des zones de signification indéterminées que chaque fournisseur avait prévues. Les couples sensibilité/spécificité des tests étaient de 89.3%/100% pour l'ELISA « maison », de 89.3%/97.1% pour le Bioflash, de 75%/100% pour l'iSYS et de 82.1%/85.3% pour le Phadia, après utilisation des nouveaux seuils de positivités des tests. Des critères de concordance analytiques et cliniques ont été définis afin de comparer ces tests. Le Bioflash et l'Isys sont les tests les moins discordants avec l'ELISA « maison » (8.6% et 9.3%, respectivement), là où le Phadia l'est à 19.8%. Les gains attendus, en termes de praticité et de traçabilité, sans dégradation significative des performances par rapport à l'ELISA « maison », permettent d'envisager l'automatisation de ce dosage en confiance avec une technique CLIA.

TITLE

Systemic lupus erythematosus and double stranded anti-DNA antibody: comparison of methods between a "in-home" ELISA and automated techniques

Summary

Although anti-double stranded DNA IgG assays are calibrated using an international standard, the polyclonal immune response, the diversity of auto-antibodies produced, and the intrinsic differences between assays, make comparisons difficult between different tests. Different groups of lupus patients were selected and analyzed in order to take into account clinical heterogeneity and the different stages of the disease. We compared a "in-house" ELISA, with three automated kits: the CLIA from IDS on iSYS, the CLIA Quanta-Flash from Werfen on Bioflash and the Elia from Thermofischer on Phadia (now Unicap). The ROC curves were determined using sera from patients with lupus at the time of diagnosis, free from any treatment and we have adapted the cutoffs to improve performances and to overcome values of undetermined significance, provided by the suppliers. Sensitivity / specificitiy with these cutoffs were 89.3% / 100% for the "in-house" ELISA, 89.3% / 97.1% for the Bioflash, 75% / 100% for the iSYS and 82.1% / 85.3% for Phadia. Analytical and clinical concordance criteria were defined in order to compare those tests. Bioflash and iSYS were less discordant with the "in-house" ELISA (8.6% and 9.3%, respectively), than Phadia 19.8%. The expected benefits, in terms of ease of use and traceability, without significant deterioration in performances compared to the "in-house" ELISA, allow automation of this dosage using CLIA technique.

Mots-clés

Lupus Erythémateux Systémique ; Anticorps anti-ADN natif ; Comparaison de méthode ; Automatisation