

ANTICORPS ANTI-PROTEINES / PEPTIDES CITRULLINES DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

Farid BENKHADRA et René-Louis HUMBEL

Laboratoire luxembourgeois d'immunopathologie (LLIP) ¹

RESUME

Parmi les marqueurs biologiques de la polyarthrite rhumatoïde (PR), le plus connu et le plus utilisé est le facteur rhumatoïde (FR) qui constitue encore un des 7 critères de la classification de la PR de l'American College of Rheumatology (ACR). Ces marqueurs sont sensibles, présents lors des manifestations extra-articulaires et des formes sévères de PR, mais manquent de spécificité. En revanche, les anticorps anti-protéines ou peptides citrullinés, de découverte récente, s'avèrent d'une excellente spécificité vis à vis de la PR bien que de sensibilité équivalente aux FR. Ils permettent également de prédire les formes les plus agressives de la maladie qui nécessitent une prise en charge adaptée. Les progrès récents de détection de ces anticorps, liés à l'identification des cibles antigéniques, ont permis d'améliorer les performances analytiques et diagnostiques des trousse de réactifs.

HISTORIQUE

En 1964, un groupe de chercheurs hollandais Nienhuis et coll. a mis en évidence dans le sérum de malades atteints de PR des anticorps marquant, en immunofluorescence indirecte, les grains de kératohyaline du cytoplasme des cellules épithéliales de la muqueuse buccale humaine. Ces anticorps ont été appelés « facteur péri-nucléaire ». Quinze années plus tard, Young et col. de Londres décrivent des anticorps qui se fixent sur la couche cornée de l'épithélium malpighien de l'oesophage de rat. En raison de cette localisation histologique, ces anticorps ont été dénommés « anticorps anti-kératine ». Vingt ans après, c'est un groupe de chercheurs français, avec Guy Serre de Montpellier, qui identifie l'antigène cible de ces anticorps. Cet antigène n'est pas la kératine comme on le pensait mais une protéine permettant l'agrégation des filaments de cytokératine, la filagrine. Cette importante découverte a incité les chercheurs à utiliser la filagrine purifiée à partir d'extraits d'épiderme humain ou d'oesophage de rat pour rechercher les anticorps correspondants. Les résultats furent décevants puisque la sensibilité des tests était très faible et très variable. En 2000, l'équipe néerlandaise de Schellekens montre que les déterminants antigéniques présents sur la filagrine et reconnus par les anticorps étaient en réalité constitués de résidus de citrulline. La citrulline est un acide aminé non encodé par l'ADN mais résultant de la transformation post-traductionnelle de l'arginine. Cette transformation est une étape de désimination placée sous l'action d'une enzyme, la peptidylarginine désiminase (PAD). Il existe différentes isoformes de PAD, dont la PAD2 et la PAD4 qui sont contenues dans les leucocytes. L'activité de la PAD est fortement dépendante des ions Ca⁺⁺. La concentration intracellulaire physiologique en Ca⁺⁺ est

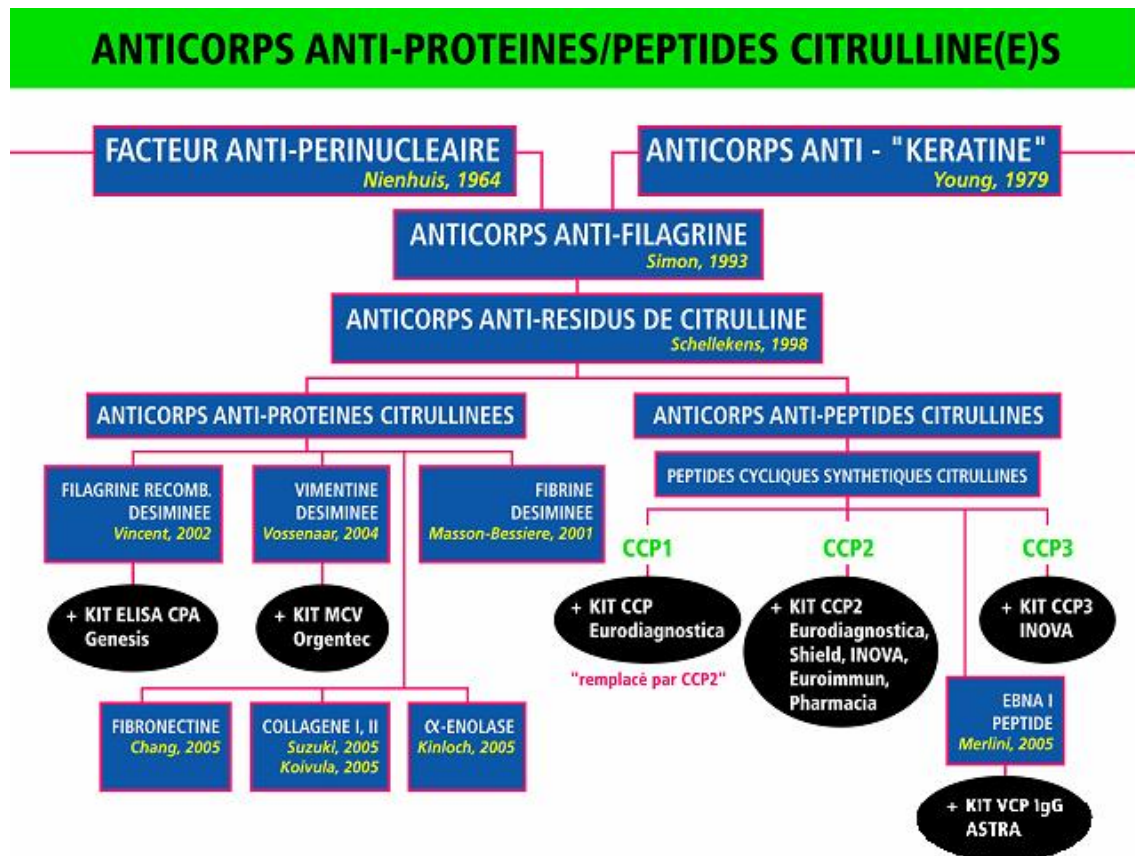
¹ correspondance : rlhumbel@llip.lu

trop faible pour soutenir l'activité enzymatique. En revanche, en cas d'atteinte à l'intégrité des cellules (inflammation, nécrose, apoptose), un afflux important de calcium à l'intérieur de la cellule entraîne une activation de la PAD avec comme conséquence une accentuation de la « citrullination » de certaines protéines. Cette modification entraîne une augmentation de l'hydrophobicité ainsi qu'un désenroulement de la protéine citrullinée suite à la modification de charges. En effet, alors que l'arginine est chargée positivement, la citrulline est neutre. De nombreuses protéines de l'organisme subissent une citrullination dont la filagrine, la protéine basique de la myéline, la vimentine et le fibrinogène. Parmi celles-ci, seuls la vimentine et le fibrinogène sont présents dans la synoviale enflammée. La réaction avec la filagrine relève donc d'une réaction croisée avec des épitopes citrullinés communs à ces protéines.

Plus récemment, on a également montré que le collagène, la fibronectine et l' α -énolase, une fois citrullinés, pouvaient réagir avec les anticorps du sérum des malades atteints d'une PR.

La citrullination des protéines au niveau de la synoviale est un phénomène survenant au cours de l'inflammation. En revanche, la production des anticorps contre les résidus citrullinés est tout à fait spécifique de la PR. Il semble exister un lien entre la production des anticorps et les allèles HLA associés à un risque élevé de PR (en cas d'épitopes partagés dans les haplotypes HLA-D1 et DR4).

La figure ci-dessous résume l'évolution des méthodes analytiques de détection des anticorps anti-protéines/peptides citrullinés.

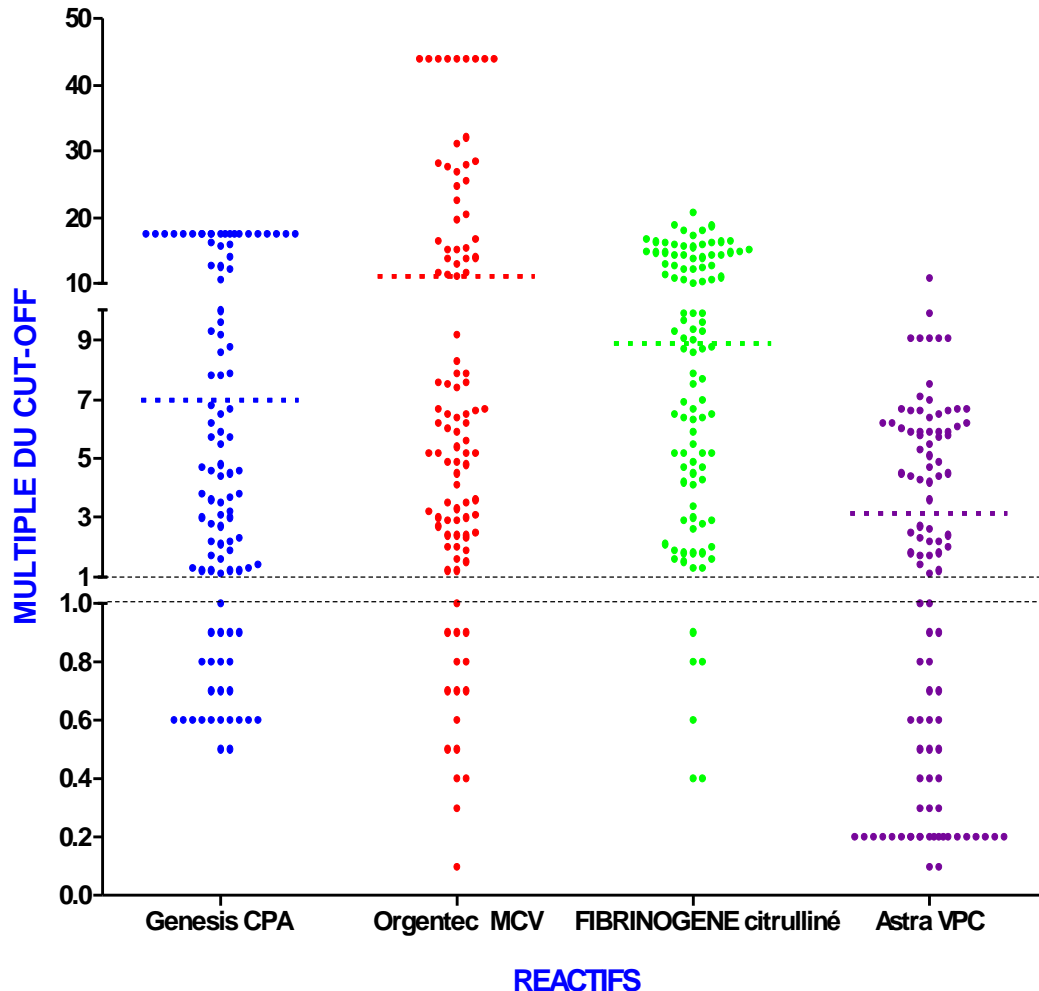


ANTICORPS ANTI-PROTEINES CITRULLINEES

Différentes protéines citrullinées sont utilisées pour la recherche des anticorps anti-résidus citrullinés. La filagrine recombinée de rat, citrullinée *in vitro*, est utilisée dans un test ELISA commercialisé par la société GENESIS sous le nom de CPA. La firme allemande ORGENTEC, utilise de son côté une forme mutante de la vimentine, qui, une fois citrullinée, réagit de façon spécifique avec les anticorps des sérums atteints de PR (test MCV). Leur autre protéine citrullinée, particulièrement intéressante, puisqu'elle est présente dans la synoviale rhumatoïde, est la fibrine. Les chaînes α et β de la fibrine sont porteuses d'épitopes citrullinés analogues à ceux portés par les filagrines. Leur ELISA, utilisant la fibrinogène humaine citrullinée a été mise au point par l'équipe de Guy Serre à Montpellier. Des chercheurs italiens ont pu montrer que l'une des protéines du virus d' Epstein-Barr, l' EBNA 1, contient dans sa région N-terminale une séquence d'acides aminés riche en arginine. Cette séquence a été synthétisée en substituant les résidus d'arginine par la citrulline. Le nouveau peptide est utilisé dans le test ELISA VPC récemment commercialisé par la firme italienne ASTRA. Il n'existe pas à ce jour de réactifs commerciaux utilisant le collagène, la fibronectine ou l' α -énolase citrullinés.

L'étude réalisée dans notre laboratoire sur une population de 102 patients atteints de PR a mis en évidence une différence importante de sensibilité en fonction des substrats antigéniques citrullinés, alors que la spécificité est satisfaisante. Ces différences sont à mettre sur le compte de la nature et la composition des substrats antigéniques utilisés, et en particulier sur le nombre de résidus citrullinés et leur localisation dans l'environnement de la chaîne peptidique.

Histogramme de distribution des valeurs d'Ac des trousse de réactifs CPA/MCV/FIBRINOGENE/VPC



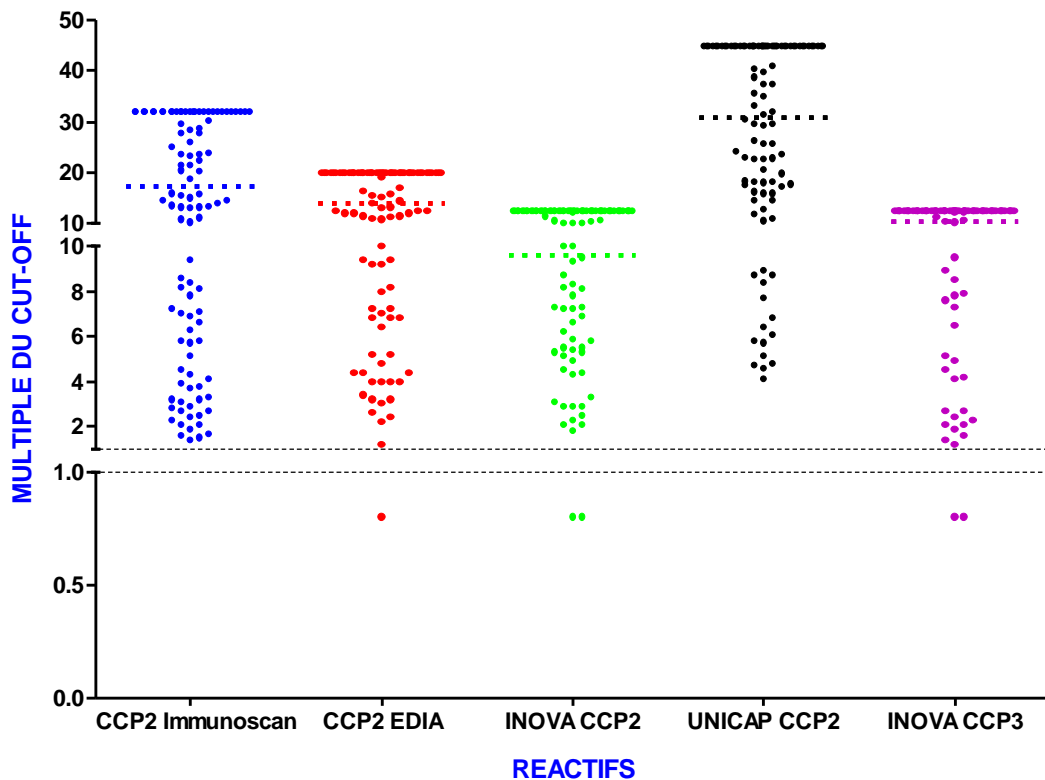
ANTICORPS ANTI-PEPTIDES SYNTHETIQUES CITRULLINES

A partir des informations livrées par la structure antigénique de la filagrine humaine, des peptides ont été synthétisés, citrullinés puis cyclisés, et ont été sélectionnés en raison de leur réactivité élevée avec les anticorps des malades atteints de PR (CCP1). Dans un second temps on a préparé de nouveaux peptides qui n'ont plus aucune homologie avec la filagrine ou d'autres protéines connues (CCP2 et CCP3). Ils ont été sélectionnés à partir d'une librairie de peptides, par leur forte réactivité avec le sérum de patients avec PR. La plupart des trousse de réactifs actuellement commercialisés pour la recherche des anti-CCP utilisent exactement le même substrat peptidique CCP2.

Nous avons effectué une étude comparative de 4 trousse de réactifs qui utilisent le même peptide citrulliné CCP2 sur une cohorte de 102 patients atteints d'une PR. Nous avons noté une bonne concordance des résultats qualitatifs entre les trousse. En revanche, la distribution des valeurs par rapport au cut-off analytique propre à chaque trousse, est très variable.

On constate que la trousse UNICAP permet une meilleure discrimination, la valeur la plus basse observée étant située à plus de 4 fois le cut-off, contre deux fois pour les autres trousse.

Histogramme de distribution des valeurs d'Ac des trousse CCP2 et CCP3 en fonction du multiple du cut-off

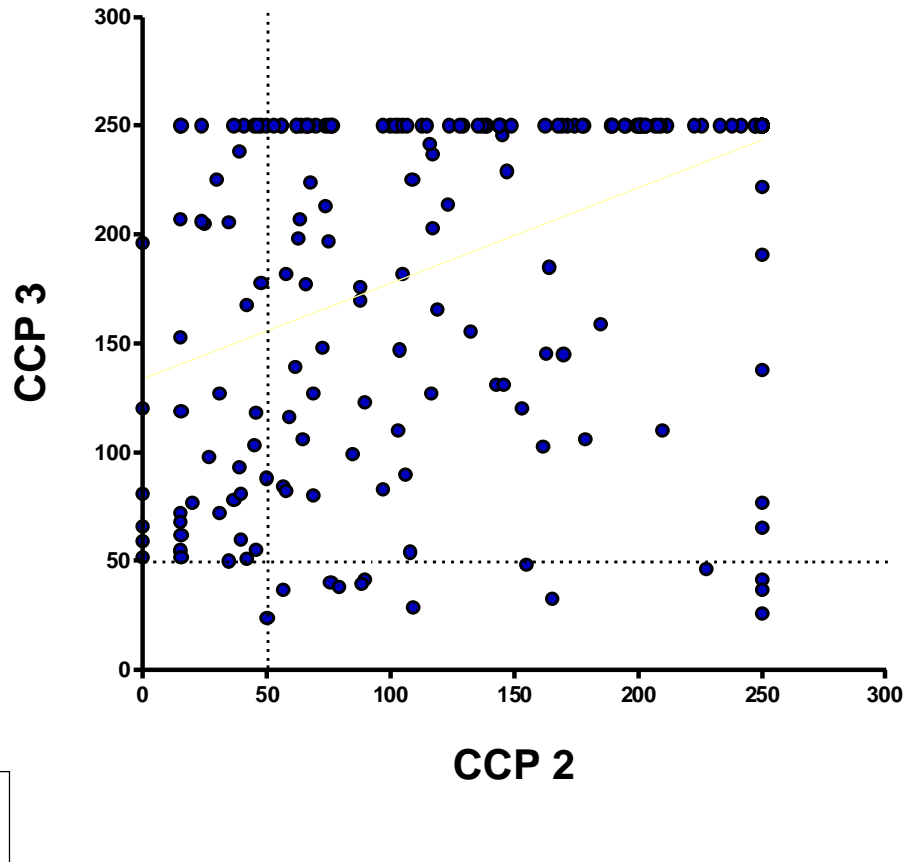


Dans une étude plus récente portant sur 317 patients ayant une PR, on a recherché les CCP2 chez les 193 patients connus pour être CCP3+ et les CCP3 chez les 124 patients connus pour être CCP2+.

On constate que l'on retrouve des valeurs similaires de CCP2 et de CCP3 chez 143 patients (45.1%), des valeurs significativement supérieures de CCP3 versus CCP2 chez 144 patients (45.4%) contre des valeurs significativement supérieures de CCP2 versus CCP3 chez 30 patients. Par ailleurs, on observe 41 faux négatifs en CCP2 versus 11 faux négatifs en CCP3, ce qui rapporté au prorata de la distribution

initiale des patients en fonction de leur statut vis à vis des CCP, correspond à une sensibilité de 79% pour les CCP2 contre 92% pour les CCP3.

Corrélation CCP2-CCP3



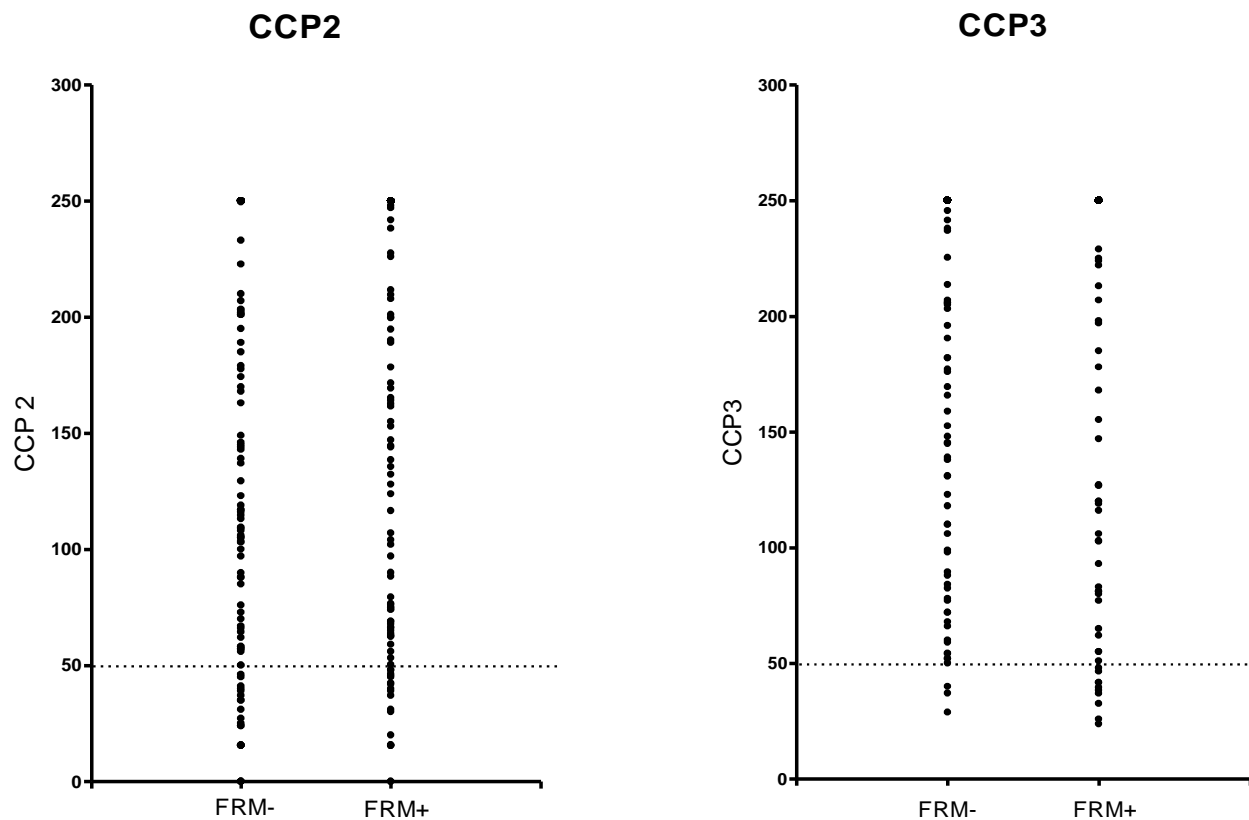
ANTICORPS ANTI-PROTEINES/PEPTIDES CITRULLINES ET POLYARTHRITE RHUMATOIDE

Les anticorps anti-résidus citrullinés constituent à ce jour les marqueurs les plus spécifiques de la PR puisqu'on ne les retrouve que rarement au cours des autres maladies rhumatismales. Les autres anti-CCP, qui ont été plus étudiés, se sont révélés être des marqueurs précoces de la PR permettant d'identifier la maladie à un stade très précoce. D'autre part, la présence de ces anticorps est associée à des formes sévères de la PR. La fréquence des érosions est 10 fois plus élevée chez les patients avec des anti-CCP.

La polyarthrite rhumatoïde est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Elle se caractérise par une inflammation du tissu synovial, pouvant conduire à une destruction irréversible du tissu osseux et cartilagineux des articulations. Il est désormais admis qu'un traitement de fond instauré durant les trois premiers mois de la maladie peut prévenir ou limiter la destruction articulaire caractéristique de cette maladie. On dispose pour cela de nouveaux médicaments, en particulier les biothérapies à base d'inhibiteurs des TNF-alpha qui permettent de réduire l'inflammation et de contrôler l'activité de la maladie. Du fait de leur impact sur le système immunitaire, mais aussi à cause de leur coût très élevé, ces médicaments doivent être réservés aux malades qui risquent d'évoluer vers une PR grave. Ces anticorps anti-CCP sont à cet égard un outil très précieux car ils caractérisent précisément les PR qui sont susceptibles d'évoluer vers une forme grave de la maladie, avec, en particulier des destructions osseuses.

Il n'existe pas de corrélation entre la présence des facteurs rhumatoïdes (FR) et les anti-CCP. Il existe des PR qui sont uniquement associées à la présence de FR et d'autres uniquement avec des anti-CCP. Les deux marqueurs biologiques doivent donc être utilisés pour le diagnostic de la PR. Les thérapies actuelles ne modifient pas de façon significative les titres des anticorps anti-CCP. En revanche, les FR baissent très rapidement sous traitement efficace permettant un suivi à court terme de l'évolution d'une PR.

Corrélation CCP2-FRM et CCP3-FRM



Par ailleurs, il semble légitime, chez des patients séronégatifs (FR et CCP négatifs) ayant des manifestations articulaires mais chez lesquels le clinicien a une forte présomption de PR, de rechercher des anticorps anti-CCP d'une autre génération que ceux demandés en screening.

Bibliographies

Les références bibliographiques peuvent être consultées dans ces 2 articles récents :

1. le point sur les autoanticorps anti-protéines et anti-peptides citrullinés. R.L. Humbel, N.O Olsson – Biotribune 2005 ; n°17, pages 34-36
2. étude comparative de 9 trousse de réactifs détectant des anticorps anti-protéines ou peptides citrullinés. F. Benkhadra, I. Hila, G. Foerster, V. Pierrard, R.L. Humbel – article à paraître très prochainement dans la revue de la CORATA Immuno-analyse et Biologie spécialisée (IBS) à la rubrique « techniques au quotidien »