

Le point sur les autoanticorps anti-protéines et anti-peptides citrullinés

Plusieurs types d'autoanticorps peuvent être mis en évidence dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). Le plus connu et le plus utilisé est le facteur rhumatoïde (FR) qui constitue encore un des sept critères de classification de la PR de l'American College of Rheumatology. Cependant, si les FR sont des marqueurs sensibles, ils ne sont pas totalement spécifiques de la PR. En revanche, les anticorps anti-protéines ou peptides citrullinés(e)s sont récemment apparus comme ayant une bonne sensibilité et surtout une spécificité très élevée vis-à-vis de la PR. Ils permettent d'en poser le diagnostic de façon très précoce et de prédire les formes les plus agressives de la maladie qui nécessitent une prise en charge adaptée.

Les progrès récents des méthodes de détection des anticorps anti-protéines/peptides citrullinés(e)s, liés à l'identification des cibles antigéniques, ont permis d'augmenter fortement leurs performances analytiques et diagnostiques. La figure 1 résume l'évolution de ces méthodes de détection.

René-Louis HUMBEL⁽¹⁾, Nils-Olivier OLSSON⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire Luxembourgeois d'Immunopathologie, Esch/Alzette, Luxembourg - E-mail : rlhumbel@llip.lu

⁽²⁾ Centre Hospitalier Universitaire, Dijon - E-mail : nils.olsson@chu-dijon.fr

I. ANTICORPS ANTI-PROTÉINES CITRULLINÉES

Le premier de ces anticorps est le "facteur anti-périnucléaire" (APF) découvert en 1964 par Nienhuis et coll. (1). Cet anticorps marque, en immunofluorescence indirecte, les grains de kératohyaline du cytoplasme des cellules épithéliales de la muqueuse buccale humaine. Le second anticorps de ce groupe, est décrit en 1979 par Young et coll. (2). Il se fixe sur la couche cornée de l'épithélium malpighien de l'œsophage de rat, et, en raison de cette localisation, a été appelé, à tort, anticorps anti-kératine (AKA). Les anticorps recherchés par immunofluorescence indirecte ne sont retrouvés que dans la moitié des cas de PR. Le APF et les AKA dépendent en fait d'un même antigène, la filagrine (et son précurseur la profilagrine), une protéine impliquée dans l'agrégation des filaments de cytokeratine (Filament Aggregating Protein) (3). Cette découverte a aussitôt incité les chercheurs à utiliser la filagrine, purifiée à partir d'épiderme humain ou d'œsophage de rat, comme antigène pour la recherche des anticorps correspondants par immunotransfert ou ELISA. La sensibilité de ces tests s'est révélée très variable et globalement très faible (12 à 47 %). En 1998, il a pu être démontré que les déterminants antigéniques reconnus par les anticorps du sérum de patients atteints de PR sont constitués de résidus citrullinés présents sur certaines isoformes de la filagrine (4). La citrulline est un acide aminé qui n'est pas encodé par l'ADN. Elle résulte d'une modification post-traductionnelle qui transforme les résidus arginyl en résidus citrullyl (voir encadré ci-contre). La filagrine « native » peut être citrullinée *in vitro* sous l'action de la peptidylarginine désiminase (PAD). Vincent et coll. (5) ont développé en 2000 un test ELISA basé sur l'utilisation de la filagrine recombinée de rat, citrullinée *in vitro*. Un test basé sur ce principe a été récemment commercialisé par la firme GENESIS (UK) sous le nom de CPA (citrullinated protein antibodies).

Divers travaux ont montré que d'autres protéines citrullinées sont également reconnues par les anticorps du sérum des malades atteints de PR. Déjà en 1994, Desprès et col (6) ont décrit un autoanticorps présent dans le sérum de 50 % des patients atteints de PR. Cet anticorps réagit avec

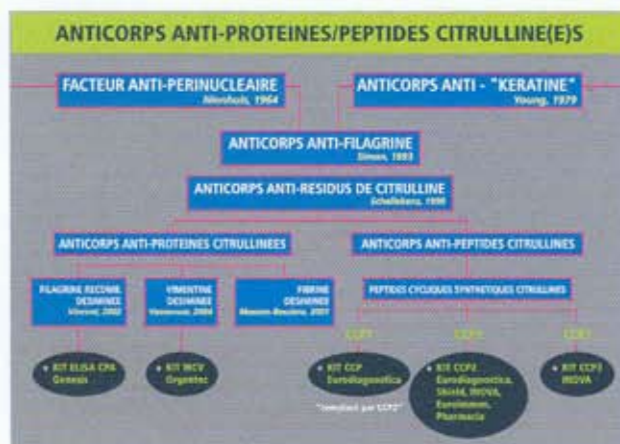


Figure 1

un antigène (l'antigène Sa) que l'on peut extraire du placenta ou de la rate humaine. L'antigène Sa a pu être récemment identifié avec la vimentine citrullinée (7). La vimentine est un constituant majeur des filaments intermédiaires du cytosquelette des cellules mésangiales (fibroblastes, chondrocytes, ostéocytes) et des leucocytes. Contrairement à la filagrine, la vimentine est largement présente dans la synoviale. Il existe plusieurs isoformes de la vimentine ainsi que des mutants. Les chercheurs de la firme allemande ORGETEC ont pu isoler récemment une forme mutante de la vimentine, qui, une fois citrullinée, réagit de façon spécifique avec les anticorps du sérum des malades atteints de PR. Ils viennent de mettre sur le marché un test ELISA, appelé MCV (Mutated Citrullinated Vimentin) pour la recherche de ces anticorps.

Une 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 la filagrine (8). Des anticorps contre la fibrine et le fibrinogène désiminés sont retrouvés dans la PR avec, semble-t-il, la même fréquence que pour les autres protéines citrullinées (9). Il n'existe aucun test commercial à l'heure actuelle pour la recherche des anticorps anti-fibrine citrullinée.

II. ANTICORPS ANTI-PEPTIDES CITRULLINÉS

A partir des informations livrées par l'étude de la structure antigénique de la filagrine humaine, des peptides ont été synthésés, citrullinés et cyclisés (4). Un premier peptide, cfc1-cyc ou CCP1 (cyclic citrullinated peptide 1), a été sélectionné en raison de sa réactivité élevée avec les anticorps des malades atteints de PR. Un test ELISA a été commercialisé sur ce modèle fin 2000 par la firme hollandaise EURODIAGNOSTICA. Sa sensibilité pour la PR s'est avérée être de 75 % environ. Des travaux ultérieurs ont conduit à la préparation d'autres peptides citrullinés synthétiques. Ces nouveaux peptides n'ont aucune homologie avec la filagrine ou d'autres protéines connues. Ils ont été sélectionnés, à partir d'une librairie de peptides, pour leur réactivité avec le sérum de patients atteints de PR. Un test de seconde génération appelé anti-CCP2 est apparu sur le marché en mars 2004. Toutes les trousse de réactifs actuellement commercialisés pour la recherche des anti-CCP utilisent exactement le même substrat peptidique CCP2. Cette nouvelle version s'est avérée plus sensible pour le diagnostic de la PR (10). Un brevet ayant été déposé pour les peptides CCP1 et CCP2, la recherche s'est orientée vers d'autres peptides synthétiques susceptibles d'en contourner les contraintes tout en assurant des performances iden-

tiques, voire meilleures. Une troisième génération de peptides, CCP3, vient ainsi de voir le jour : elle est utilisée dans une nouvelle trousse de réactifs mis au point par INOVA (USA).

De nouveaux peptides citrulinés vont certainement faire leur apparition dans un très proche avenir. Des chercheurs italiens (11) viennent en effet de montrer que l'une des protéines du virus d'Epstein-Barr, EBNA 1, contient dans sa région N-terminale (positions 35-58) une séquence d'acides aminés riche en arginine. Cette séquence a été synthétisée en substituant les résidus d'arginine par la citrulline. Le peptide obtenu réagit bien avec les anticorps anti-CCP2. Pour le moment, il n'existe pas de réactifs commerciaux basés sur l'utilisation de ce peptide. Des études sont également en cours en Norvège (12), orientées vers l'utilisation de télopeptides citrulinés homologues du collagène II. Ces peptides possèdent au niveau de leur extrémité C-terminale de nombreux résidus d'arginine qui sont susceptibles d'être désiminés en résidus citrulinés sous l'action de la PAD. Le tableau I donne un aperçu des différents tests commerciaux actuellement disponibles pour la recherche des anticorps anti-protéines/peptides citruliné(e)s. Ces anticorps constituent à ce jour les marqueurs les plus spécifiques de la PR mais leur sensibilité ne dépasse pas celle du facteur rhumatoïde (10, 13, 14). Les meilleures performances diagnostiques sont obtenues en associant la recherche de ces deux marqueurs, en sachant bien que chacun d'eux peut être présent en l'absence de l'autre. Une autre caractéristique importante de ces anticorps est leur association avec les formes évolutives sévères de la PR : ils définissent peut-être une forme grave de la maladie (15, 16, 17). Leur association avec le déterminant HLA DR4 doit aussi être soulignée. Des anticorps anti-protéines ou peptides citruliné(e)s sont très rarement rencontrés dans

d'autres affections que la PR : il s'agit surtout de spondylarthropathies, du lupus systémique et de la maladie de Sjögren (9).

Concernant le choix des méthodes, il nous est apparu, à la suite d'études récentes (à publier), que les anticorps anti-peptides citrulinés CCP2 et CCP3, présentent une sensibilité plus élevée que les anticorps anti-protéines citrulinées. ■

Tableau I : Réactifs actuellement commercialisés pour la recherche des anticorps anti-protéines et peptides citruliné(e)s

	FABRICANTS	ANTIGÈNE	MÉTHODE
ANTI-CCP	EURODIAGNOSTICA SHIELD EUROIMMUN INOVA	CCP2 (préparation identique pour les 4 trousses)	ELISA
	PHARMACIA	CCP2 (même préparation que ci-dessus)	IMMUNO-ENZYMO- FLUORIMÉTRIE
ANTI-CCP3	INOVA	CCP3	ELISA
ANTI-CPA	GENESIS	Filagrine de rat recombinée et désiminée	ELISA
ANTI-MCV	ORGENTEC	Vimentine mutée citrulinée	ELISA

RÉFÉRENCES

- Nienhuis RLF, Mandema E, Smids C. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis, the antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis.* 1964;23:302-5.
- Young BJJ, Mallya RK, Leslie RDG, Clark CJM, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J.* 1979;2:97-9.
- Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomès-Daudrix V, Vincent C, Salama G, et al. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies", antibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1993;92:1383-93.
- Schellekens GA, De Jong BA, Van Den Hoogen FH, Van De Putte LB, Van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998;101:273-81.
- Vincent C, Nogueira L, Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Arnaud M, Letourneur O, et al. Detection of antibodies to determined recombinant rat filaggrin by enzyme-linked immunosorbent assay: a highly effective test for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2051-8.
- Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Menard HA. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1994;2:1027-33.
- Vasenaar ER, Despres N, Lapointe E, Van Der Heijden, Lara M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:R142-50.
- Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhausser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deaminated forms of the α and β -chains of fibrin. *J Immunol.* 2001;166:4177-84.
- Nielsen MM, Van Der Horst AR, Van Schaardenburg D, Van Der Horst-Bruinsma IÉ, Van De Stadt RJ, Aarden L, et al. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1199-204.
- Van Gaalen FA, Visser M, Huizinga TWJ. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1510-2.
- Merlini G, Anzilotti C, Chimentì D, Tommasi C, Bombardieri S, Migliori P. A deaminated viral peptide to detect antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1050:243-9.
- Koivula MK, Amon S, Karjalainen A, Hakala M, Risteli J. Are there autoantibodies reacting against citrullinated peptides derived from type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1443-50.
- Raza K, Breese M, Nightingale P, Kumar K, Patter T, Carruthers DM, et al. Predictive value of antibodies to citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis. *J Rheumatol.* 2005;32:231-8.
- Dubucquoi S, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerie L, Sibilla J, Goetz J, et al. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:415-9.

15. Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, Van Venrooij WJ, De Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004;50:709-15.

16. De Rycke L, Peene I, Hoffman IÉ, Kruihof E, Union A, Meheus L, et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:1587-93.

17. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis.* 2004;63:1085-9.

La citrullination des protéines consiste en la transformation, par un processus de désimination, des résidus arginyl en résidus citrullyl sous l'action d'une enzyme, la peptidylarginine désiminase (PAD).

La désimination des résidus d'arginine rompt les ponts non covalents intramoléculeaires et altère profondément la structure tertiaire ainsi que la charge des protéines.

La citrullination augmente l'affinité des protéines pour les molécules HLA-DR4 et -DR1, dont l'expression est particulièrement fréquente dans la PR.

Il existe 5 isoformes de la peptidylarginine désiminase (PAD). La PAD2 est exprimée dans les macrophages et la PAD4 dans les granulocytes des cellules qui s'accumulent dans la synoviale enflammée. Il en résulte une stimulation de la citrullination de certaines protéines présentes dans l'articulation, en particulier la vimentine et la fibrine. La citrullination des protéines n'est pas spécifique de la PR, mais ce n'est que chez les sujets génétiquement prédisposés, HLA-DR4, qu'une réponse auto-immune contre ces protéines se développe.

Pour plus d'informations consulter :

Yamada R, et al : Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 2005;10:54-64.

Figure 1 : Evolution des méthodes de détection des anticorps anti-protéines/peptides citruliné(e)s