

Sous la direction de
Loïc Guillevin
Olivier Meyer
Éric Hachulla
Jean Sibilia

Traité des **Maladies** et **syndromes** **systemiques**

6^e édition

m

Lavoisier
Médecine
SCIENCES

Traité
des **Maladies**
et **syndromes**
systemiques

6^e édition

Chez le même éditeur

Dans la collection « Traités »

Traité d'imagerie médicale, par H. Nahum
Traité d'anesthésie et de réanimation, par O. Fourcade, T. Geeraerts, V. Minville et K. Samii
Traité européen de psychiatrie et de psychopathologie de l'enfant et de l'adolescent, par P. Ferrari et O. Bonnot
Traité d'addictologie, par M. Reynaud
Traité de psychiatrie, par M. Gelder, R. Mayou et P. Cowen
Traité de médecine et chirurgie de l'obésité, par A. Basdevant, J.-L. Bouillot, K. Clément, J.-M. Oppert et P. Tounian
Traité de nutrition clinique de l'adulte, par A. Basdevant, M. Laville et É. Lerebours
Traité de diabétologie, par A. Grimaldi
Traité d'endocrinologie, par Ph. Chanson et J. Young
Traité de prévention, par F. Bourdillon
Traité de santé publique, par F. Bourdillon, G. Brücker et D. Tabuteau
Manuel d'échocardiographie clinique, par A. Cohen et P. Guéret
Cardiopathies valvulaires de l'adulte, par B. Cormier, E. Lansac, J.-F. Obadia et C. Tribouilloy
Médecine cardiovasculaire du sujet âgé, par P. Assayag, J. Belmin, J.-M. Davy, J.-N. Fiessinger, P. Friocourt, G. Jondeau, J. Puel et Ch. Tivalle
Traité de thérapeutique cardiovasculaire, par P. Ambrosi
Traité de pneumologie, par M. Aubier
Traité d'allergologie, par D. Vervloet et A. Magnan
Traité d'ORL, par D. Brasnu, D. Ayache, S. Hans, D.M. Hartl et J.-F. Papon
Traité de médecine hospitalière, par J.-P. Grünfeld
Traité de thérapeutique rhumatologique, par Th. Bardin et Ph. Orcel
Maladies métaboliques osseuses de l'adulte, par M.-C. de Vernejoul et P. Marie
Traité de proctologie, par Ph. Godeberge
Traité de pancréatologie clinique, par Ph. Lévy, Ph. Ruszniewski et A. Sauvanet
Traité de gynécologie, par H. Fernandez, C. Chapron et J.-L. Pouly
Traité d'obstétrique, par D. Cabrol, J.-C. Pons et F. Goffinet
Principes de médecine interne Harrison, par D.L. Longo, A.S. Fauci, D.L. Kasper, S.L. Hauser, J.L. Jameson, J. Loscalzo
Traité de médecine, par P. Godeau, S. Herson et J.-Ch. Piette

Dans d'autres collections

Œil et maladies systémiques, par P. Sève et L. Kodjikian
Le livre de l'interne : médecine interne, par L. Guillevin
Sémiologie médicale, par L. Guillevin

La petite encyclopédie médicale Hamburger, par M. Leporrier
Guide du bon usage du médicament, par G. Bouvenot et C. Caulin
Le Flammarion médical, par M. Leporrier
Dictionnaire français-anglais, anglais-français des termes médicaux et des médicaments, par G.S. Hill
L'anglais médical : *spoken and written medical english*, par C. et F.-X. Coudé

Sous la direction de
Loïc Guillevin
Olivier Meyer
Éric Hachulla
Jean Sibilia

Traité des **Maladies** et **syndromes** **systemiques**

6^e édition

Préface du Professeur Marcel-Francis KAHN

1^{re} édition, 1982
2^e édition, 1985
2^e édition, 2^e tirage, 1986
2^e édition, 3^e tirage, 1987
3^e édition, 1991
3^e édition, 2^e tirage, 1991
3^e édition, 3^e tirage, 1993
3^e édition, 4^e tirage actualisé, 1995
4^e édition, 2000
4^e édition, 2^e tirage, 2001
5^e édition, 2008
6^e édition, 2015

Direction éditoriale : Fabienne Roulleaux
Coordination éditoriale : Béatrice Brottier
Secrétariat d'édition : Caroline Chevalier
Fabrication : Estelle Perez
Couverture : Isabelle Godenèche
Composition : Nord Compo, Villeneuve-d'Ascq
Impression, reliure : Grafos, Barcelone

Liste des collaborateurs

ACKERMANN Félix, Praticien, service de Médecine interne, hôpital Foch, Suresnes.

ALLANORE Yannick, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Cochin, Paris.

ALLEZ Matthieu, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Gastro-entérologie, hôpital Saint-Louis, Paris.

AMOURA Zahir, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne 2, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

AOUBA Achille, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Caen.

ARNAUD Laurent, Chef de clinique-Assistant, service de Médecine interne, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

ASLI Bouchra, Attaché, service d'Immunologie clinique, hôpital Saint-Louis, Paris.

BACH Jean-François, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, consultant, laboratoire d'Immunologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

BADER-MEUNIER Brigitte, Praticien hospitalier, service d'Immuno-Hématologie et Rhumatologie pédiatriques, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

BAILLET Athan, Chef de clinique-Assistant, clinique universitaire de Rhumatologie, CHU, Grenoble.

BALLARD Magali, ancien Chef de clinique-Assistant, service de Rhumatologie, hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris.

BARDIN Thomas, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Lariboisière, Paris.

BARETE Stéphane, Praticien attaché, service de Dermatologie-Allergologie, hôpital Tenon, Paris.

BATTISTELLA Maxime, Praticien hospitalier, service d'Anatomopathologie, hôpital Saint-Louis, Paris.

BAY Jacques-Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Thérapie cellulaire et Hématologie clinique, CHU, Clermont-Ferrand.

BENVENISTE Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne-Immunologie clinique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

BÉREZNÉ Alice, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

BERTHEAU Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Anatomopathologie, hôpital Saint-Louis, Paris.

BERTHELOT Jean-Marie, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Nantes.

BIENVENU Boris, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Caen.

BLANCO Patrick, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, CNRS/UMR 5164, service d'Immunologie et Immunogénétique, CHU, Bordeaux.

BONNET Joëlle, Praticien hospitalier, service de Gastro-entérologie, hôpital Sainte-Camille, Brie-sur-Marne.

BOURNAUD-SALINAS Claire, Praticien hospitalier, service de Médecine nucléaire, CHU, Lyon.

BOYER Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Inserm U905 ; laboratoire d'Immunologie clinique et expérimentale, CHU, Rouen.

BOYSSON Hubert de, Interne des Hôpitaux, service de Médecine interne, CHU, Caen.

BRACHEMI Soumeia, Néphrologue, Professeur adjoint à l'université de Montréal ; service de Néphrologie, CHUM, Montréal.

BREBAN Maxime, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Ambroise-Paré, Boulogne-Billancourt.

CABANE Jean, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Saint-Antoine, Paris.

CACOUB Patrice, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne-Immunologie clinique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

CADRANEL Jacques, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Pneumologie, hôpital Tenon, Paris.

CANDON Sophie, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, Inserm U1151 ; service d'Immunologie biologique, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

CANIONI Danièle, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service d'Anatomopathologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

CHANDESRIS Marie Olivia, Praticien hospitalier, service d'Hématologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

CHAPELON-ABRIC Catherine, Praticien hospitalier, service de Médecine interne-Immunologie clinique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

CHARLES Pierre, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

CHATENOUD Lucienne, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Inserm U1151 ; service d'Immunologie biologique, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

CHIOCCHIA Gilles, Directeur de recherches Inserm, Inserm U576, CNRS/UMR 8104 ; service d'Immunologie, hôpital Cochin, Paris.

CLAUDEPIERRE Pascal, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Henri-Mondor, Créteil.

CLIQUENNOIS Manuel, Chef de clinique-Assistant, service d'Hématologie clinique, hôpital Saint-Vincent de Paul, Lille.

COHEN Pascal, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

COMBE Bernard, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Montpellier.

CONSTANTIN Arnaud, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Toulouse.

COPPO Paul, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service des Maladies du sang et de Thérapie cellulaire, hôpital Saint-Antoine, Paris.

COROUGE Marion, Praticien hospitalier contractuel, service d'Hépatologie, hôpital Cochin, Paris.

COSETTE Pascal, Professeur des Universités, CNRS/URM 6270, plateforme Protéomique PISSARO, université de Rouen.

COSTEDOAT-CHALUMEAU Nathalie, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

CRABOL Yoann, Chef de clinique-Assistant, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

CRIBIER Bernard, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Dermatologie, CHU, Strasbourg.

DAMAJ Gandhi, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Hématologie clinique, CHU, Caen.

DEREURE Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Dermatologie, CHU, Montpellier.

DESAUW Christophe, Praticien hospitalier, service d'Oncologie médicale, CHU, Lille.

DIEUDÉ Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris.

DODÉ Catherine, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Biochimie et Génétique moléculaire, hôpital Cochin, Paris.

DONADIEU Jean, Praticien hospitalier, service d'Hémo-Oncologie pédiatrique, hôpital Trousseau, Paris.

DOUGADOS Maxime, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Cochin, Paris.

DUBREUIL Patrice, Directeur de recherches, UMR 891, Centre de recherches en cancérologie, Marseille.

DUCROIX Jean-Pierre, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Amiens.

DUFFAU Pierre, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne-Immunologie clinique, CHU, Bordeaux.

DUHAUT Pierre, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Amiens.

EA Hang-Korng, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Lariboisière, Paris.

EMMERICH Joseph, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine vasculaire et HTA, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris.

EYMARD Bruno, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, institut de Myologie, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

FABRE Sylvie, Praticien, service de Rhumatologie, clinique Beau-Soleil, Montpellier.

FAIN Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Saint-Antoine, Paris.

FAUTREL Bruno, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

FERMAND Jean-Paul, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Immunologie clinique, hôpital Saint-Louis, Paris.

FRAITAG Sylvie, Praticien hospitalier, service d'Anatomie pathologique, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

FRANCÈS Camille, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Dermatologie-Allergologie, hôpital Tenon, Paris.

FRÉMEAUX-BACCHI Véronique, Praticien hospitalier, service d'Immunologie clinique, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris.

GAUDIN Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, clinique universitaire de Rhumatologie, CHU, Grenoble.

GAYRAUD Martine, Professeur au Collège de Médecine, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, institut mutualiste Montsouris, Paris.

GEORGIN-LAVIALLE Sophie, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Tenon, Paris.

GODEAU Bertrand, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Henri-Mondor, Créteil.

GOËB Vincent, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Amiens.

GOTTENBERG Jacques-Éric, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Strasbourg.

GRATEAU Gilles, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Tenon, Paris.

GROSSIN Maggy, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service d'Anatomopathologie, hôpital Louis-Mourier, Colombes.

GUETTROT-IMBERT Gaëlle, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Clermont-Ferrand.

GUILLEVIN Loïc, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

HACHULLA Éric, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Lille.

HATRON Pierre-Yves, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Lille.

HAYEM Gilles, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Ambroise-Paré, Boulogne-Billancourt.

HERMINE Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Hématologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

HERSON Serge, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne-Immunologie clinique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

HILLION Sophie, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, laboratoire d'Immunologie et d'Anatomopathologie, université Bretagne occidentale, Brest.

JACQUOT Serge, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service d'Immunopathologie, CHU, Rouen.

JANIN Anne, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Pathologie, hôpital Saint-Louis, Paris.

KAHN Jean-Emmanuel, Praticien, service de Médecine interne, hôpital Foch, Suresnes.

KAVERI Srin V., Directeur de recherches, Inserm U681, université Pierre et Marie Curie, Paris.

KONÉ-PAUT Isabelle, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Pédiatrie générale-Rhumatologie pédiatrique, hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre.

LAASSOUED Kaïss, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Inserm U925 ; service d'Immunologie, CHU, Amiens.

LAZARO Estibaliz, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Bordeaux.

LE GUERN Véronique, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

LE THI HUONG Du, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

LEFEBVRE Guillaume, Assistant hospitalo-universitaire, institut d'Immunologie-Réseau éosinophile, CHRU, Lille.

LEGRÈS Luc, Ingénieur de recherches Inserm, Inserm U728 ; service d'Anatomopathologie, hôpital Saint-Louis, Paris.

LESAVRE Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Néphrologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

HERMITTE Ludovic, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service d'Hématologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

LHOTE François, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, centre hospitalier, Saint-Denis.

LIOTÉ Frédéric, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Lariboisière, Paris.

LIOTÉ Huguet, Praticien hospitalier, service de Pneumologie, hôpital Tenon, Paris.

LORTHOLARY Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service des Maladies infectieuses et tropicales, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

MAHR Alfred, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Saint-Louis, Paris.

MARIETTE Xavier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre.

MASSON Charles, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Angers.

MATHIAN Alexis, Praticien hospitalier, service de Médecine interne 2, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

MEYER Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris.

MICELI-RICHARD Corinne, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre.

MICHEL Marc, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Henri-Mondor, Créteil.

MIOSSEC Pierre, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, laboratoire d'Immunogénomique et Inflammation, CHU, Lyon.

MIRAULT Tristan, Praticien hospitalier, service de Réadaptation vasculaire, hôpital Corentin-Celton, Issy-les-Moulineaux.

MORANNE Olivier, Praticien hospitalier, service de Néphrologie, CHU, Nice.

MOREL Jacques, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Montpellier.

MORTIER Laurent, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Dermatologie, CHU, Lille.

MOURA Daniéla, Praticien, service d'Hématologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

MOUTHON Luc, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

NEVEN Bénédicte, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service d'Immuno-Hématologie et Rhumatologie pédiatriques, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

NIZARD Jacky, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Gynécologie et Obstétrique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

NOCHY Dominique, Praticien hospitalier, service d'Anatomopathologie, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris.

NUNES Hilario, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Pneumologie, hôpital Avicenne, Bobigny.

OKSENHENDLER Éric, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Immunologie clinique, hôpital Saint-Louis, Paris.

ORCEL Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Lariboisière, Paris.

ORGIAZZI Jacques, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Endocrinologie, CHU, Lyon.

PAGNOUX Christian, Praticien hospitalier, division of Medicine, department of Rheumatology, Mount Sinai Hospital, Toronto.

PALAZZO Clémence, Chef de clinique-Assistant, service de Médecine physique et Réadaptation, hôpital Cochin, Paris.

PALAZZO Elisabeth, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris.

PAPO Thomas, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris.

PEFFAULT DE LA TOUR Régis, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Hématologie-Greffe, hôpital Saint-Louis, Paris.

PICARD Capucine, Praticien hospitalier, service de Dermatologie, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

PIETTE Jean-Charles, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

PILLEBOUT Évangéline, Praticien hospitalier, service de Néphrologie-Transplantations, hôpital Saint-Louis, Paris.

PLAISIER Emmanuelle, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Néphrologie et Dialyse, hôpital Tenon, Paris.

POUCHOT Jacques, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris.

PRIEUR Anne-Marie, Praticien hospitalier, service d'Immuno-Hématologie et Rhumatologie pédiatriques, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

PUECHAL Xavier, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

QUARTIER Pierre, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Immunologie-Hématologie pédiatrique, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

RAMIREZ Carole, Praticien hospitalier, service de Neurologie, CHU, Lille.

RAUQUE Brigitte, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris.

RENAUDINEAU Yves, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie, CHU, Brest.

RICHETTE Pascal, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Lariboisière, Paris.

RICHEZ Christophe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Bordeaux.

RONCO Pierre, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Néphrologie et Dialyses, hôpital Tenon, Paris.

RONDEAU Éric, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Néphrologie et Dialyses, hôpital Tenon, Paris.

SAADOUN David, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne-Immunologie clinique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

SACRÉ Karim, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris.

SAINT-BASILE Geneviève de, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Directeur de recherches Inserm, Inserm U768 ; service d'Immunologie-Hématologie pédiatriques, hôpital Necker-Enfants malades, Paris.

SAMSON Maxime, Chef de clinique-Assistant, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

SARAUX Alain, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Brest.

SCHLEINITZ Nicolas, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, CHU, Marseille.

SENET Patrica, Praticien hospitalier, service de Dermatologie-Allergologie, hôpital Tenon, Paris.

SENSEBÉ Luc, Directeur médical et scientifique, UMR5273, CNRS/UPS/EFS, Inserm U1031 ; EFS Pyrénées-Méditerranée, Toulouse.

SEROR Raphaële, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre.

SIBILIA Jean, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Strasbourg.

SOCIÉ Gérard, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Hématologie-Transplantation, hôpital Saint-Louis, Paris.

SOGNI Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Hépatologie, hôpital Cochin, Paris.

SOUBRIER Martin, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHU, Clermont-Ferrand.

TATAR Zuzana, Chef de clinique-Assistant, service de Rhumatologie, CHU, Clermont-Ferrand.

TAZI Abdellatif, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Pneumologie, hôpital Saint-Louis, Paris.

TERRIER Benjamin, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Cochin, Paris.

THERVET Éric, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Néphrologie, hôpital européen Georges-Pompidou, Paris.

TOUITOU Isabelle, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, laboratoire de Génétique des maladies rares et auto-inflammatoires, CHU, Montpellier.

TRON François, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Immunopathologie, CHU, Rouen.

UZUNHAN Yurdagül, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service de Pneumologie, hôpital Avicenne, Bobigny.

VALEYRE Dominique, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Pneumologie, hôpital Avicenne, Bobigny.

VARIN Audrey, Chargé d'études, UMR5273, CNRS/UPS/EFS, Inserm U1031 ; EFS Pyrénées-Méditerranée, Toulouse.

VERNEUIL Laurence, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Dermatologie, CHU, Caen.

VEYRADIER Agnès, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, laboratoire d'Hématologie, hôpital Antoine-Béclère, Clamart.

VINCENEUX Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Médecine interne, hôpital Louis-Mourier, Colombes.

VITTECOQ Olivier, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Inserm U905, service de Rhumatologie, CHU, Rouen.

WECHSLER Bertrand, Professeur au Collège de Médecine, service de Médecine interne-Immunologie clinique, hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

WECHSLER Janine, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier, service d'Anatomopathologie, hôpital Henri-Mondor, Créteil.

WÉMEAU Jean-Louis, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service d'Endocrinologie, CHU, Lille.

WENDLING Daniel, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Rhumatologie, CHRU, Besançon.

YOUINOU Pierre, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, laboratoire d'Immunologie, CHU, Brest.

ZERBIB Philippe, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Chirurgie digestive et Transplantation, CHU, Lille.

ZUBER Mathieu, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, service de Neurologie et Neurovasculaire, hôpital Saint-Joseph, Paris.

Sommaire

Préface , par M.-F. KAHN	XIII
Avant-propos , par L. GUILLEVIN, O. MEYER, É. HACHULLA et J. SIBILIA	XV

PATHOGÉNIE : GÉNÉRALITÉS

Chapitre 1	Exploration de l'immunité humorale et cellulaire , par F. TRON, O. BOYER et S. JACQUOT.	3
Chapitre 2	Génétique des maladies systémiques : méthodologie et applications , par C. MICELI-RICHARD et P. DIEUDÉ.	23
Chapitre 3	Réaction inflammatoire : déclenchement et évolution , par H.-K. EA	36
Chapitre 4	Nouveaux outils biologiques : la génomique. Principes et applications , par G. CHIOCCIA et J.-É. GOTTENBERG	54
Chapitre 5	Intérêt de l'analyse protéomique dans les maladies systémiques , par P. COSETTE, O. VITTECOQ, V. GOEB, P. GAUDIN et A. BAILLET	62
Chapitre 6	Auto-anticorps dans les maladies systémiques , par Y. RENAUDINEAU, S. HILLION, A. SARAUX et P. YOUINOU.	73
Chapitre 7	Concepts actuels de l'auto-immunité , par F. TRON et J.-F. BACH	105
Chapitre 8	Analyses tissulaires , par A. JANIN, P. BERTHEAU, L. VERNEUIL, L. LEGRÈS et M. GROSSIN	124
Chapitre 9	Évaluation thérapeutique dans les maladies systémiques. Les clefs pour comprendre , par R. SEROR et M. DOUGADOS	136
Chapitre 10	Maladies systémiques et grossesse , par N. COSTEDOAT-CHALUMEAU, J. NIZARD, D. LE THI HUONG et G. GUETTROT-IMBERT	146

MALADIES AUTO-IMMUNES

Chapitre 11	Physiopathologie du lupus , par P. BLANCO, P. DUFFAU, E. LAZARO et C. RICHEL	169
Chapitre 12	Lupus érythémateux systémique , par O. MEYER.	210
Chapitre 13	Syndrome des antiphospholipides (hors grossesse) , par O. MEYER, L. ARNAUD, J.-C. PIETTE et Z. AMOURA	365
Chapitre 14	Évaluation du traitement du lupus érythémateux systémique , par A. MATHIAN, O. MEYER et Z. AMOURA	396
Chapitre 15	Manifestations systémiques de la polyarthrite rhumatoïde , par T. BARDIN, P. RICHELLE, P. DIEUDÉ, H. LIOTÉ, P. ORCEL et F. LIOTÉ. ...	434
Chapitre 16	Sclérodémie systémique , par L. MOUTHON, Y. ALLANORE, J. CABANE et É. HACHULLA	490
Chapitre 17	Fasciite avec éosinophilie (syndrome de Shulman). Syndromes sclérodermiformes , par É. PALAZZO, C. PALAZZO, M. BALLARD et M. GROSSIN	544
Chapitre 18	Syndrome de Gougerot-Sjögren , par X. MARIETTE	557
Chapitre 19	Connectivites mixtes , par G. HAYEM	591
Chapitre 20	Myopathies inflammatoires , par O. BENVENISTE, B. EYMARD et S. HERSON	609
Chapitre 21	Polychondrite chronique atrophiante , par B. TERRIER et L. GUILLEVIN	635

VASCULARITES

Chapitre 22	Classification et épidémiologie des vascularites , par A. MAHR	643
Chapitre 23	Mécanismes des vascularites primitives , par S. BRACHEMI et P. LESAVRE	657
Chapitre 24	Maladie de Horton et pseudo-polyarthrite rhizomélique , par P. DUHAUT et J.-P. DUCROIX	674
Chapitre 25	Maladie de Takayasu , par T. MIRAULT et J. EMMERICH	708
Chapitre 26	Périartérite noueuse , par M. SAMSON et L. GUILLEVIN	723
Chapitre 27	Maladie de Kawasaki , par A. AOUBA et A. MAHR	737
Chapitre 28	Polyangéite microscopique , par P. CHARLES et L. GUILLEVIN	743
Chapitre 29	Granulomatose éosinophilique avec polyangéite (Churg-Strauss) , par F. LHOUE, P. COHEN et L. GUILLEVIN	748
Chapitre 30	Granulomatose avec polyangéite (Wegener) , par C. PAGNOUX	775
Chapitre 31	Pronostic des vascularites associées aux ANCA et de la périartérite noueuse. Complications des traitements , par M. GAYRAUD	807
Chapitre 32	Syndrome de Goodpasture , par E. PLAISIER, J. CADRANEL et P. RONCO	815
Chapitre 33	Syndrome de Cogan , par P. VINCENEUX et J. POUCHOT	832
Chapitre 34	Thromboangéite oblitérante (maladie de Buerger) , par X. PUÉCHAL	843
Chapitre 35	Purpura rhumatoïde , par É. PILLEBOUT, D. NOCHY et É. THERVET	854
Chapitre 36	Autres vascularites et pseudo-vascularites , par C. FRANCÈS, P. CACOUB et P. SENET	873
Chapitre 37	Vascularites secondaires aux affections systémiques et auto-immunes , par A. AOUBA et B. BIENVENU	894
Chapitre 38	Maladie de Behçet , par D. SAADOUN, P. CACOUB et B. WECHSLER	903
Chapitre 39	Manifestations extrahépatiques associées à l'infection chronique par le virus de l'hépatite C , par P. CACOUB, B. TERRIER, P. COHEN et D. SAADOUN	922
Chapitre 40	Vascularites cryoglobulinémiques , par P. CACOUB, D. SAADOUN et B. TERRIER	929
Chapitre 41	Vascularites des maladies malignes , par O. FAIN	938
Chapitre 42	Vascularites du système nerveux central , par H. DE BOYSSON et M. ZUBER	941
Chapitre 43	Maladie associée aux IgG₄ , par P.-Y. HATRON et N. SCHLEINIZ	948

MANIFESTATIONS ET AFFECTIONS SYSTÉMIQUES

Chapitre 44	Manifestations systémiques des spondyloarthrites , par D. WENDLING, P. CLAUDEPIERRE, G. HAYEM et M. BREBAN	963
Chapitre 45	Manifestations systémiques des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et de la maladie coeliaque , par J. BONNET et M. ALLEZ	981
Chapitre 46	Maladie de Whipple , par X. PUÉCHAL	1000
Chapitre 47	Manifestations systémiques des hépatopathies auto-immunes , par M. COROUGE et P. SOGNI	1012
Chapitre 48	Manifestations systémiques des thyroïdites auto-immunes , par C. BOURNAUD-SALINAS et J. ORGIAZZI	1036
Chapitre 49	Manifestations systémiques des syndromes lymphoprolifératifs , par B. ASLI et J.-P. FERMAND	1043
Chapitre 50	Syndrome POEMS , par M. SOUBRIER, Z. TATAR et J.-O. BAY	1051
Chapitre 51	Maladies de Castleman , par É. OKSENHENDLER	1064
Chapitre 52	Mastocytoses , par M. O. CHANDESRI, S. BARETE, S. GEORGIN-LAVIALLE, G. DAMAJ, S. FRAITAG, D. CANIONI, L. LHERMITTE, D. MOURA, P. DUBREUIL, O. LORTHOLARY et O. HERMINE	1077
Chapitre 53	Syndromes hyperéosinophiliques , par J.-E. KAHN, G. LEFEBVRE et F. ACKERMANN	1104
Chapitre 54	Syndrome hémophagocytaire , par P. COPPO, G. DE SAINT-BASILE et K. LASSOUED	1114
Chapitre 55	Histiocytoses , par A. TAZI, J. DONADIEU et J. WECHSLER	1129

Chapitre 56	Hypodermes , par M. BATTISTELLA et B. CRIBIER	1150
Chapitre 57	Dermatoses neutrophiliques , par O. DEREURE et C. FRANCÈS	1163
Chapitre 58	Maladies du tissu conjonctif (élastopathies et autres affections) , par M. BATTISTELLA et B. CRIBIER	1176
Chapitre 59	Manifestations systémiques des cancers épithéliaux , par C. DESAUW, J.-L. WÉMEAU, C. RAMIREZ, L. MORTIER, O. MORANNE, P. ZERBIB, M. CLIQUENNOIS, É. HACHULLA et P.-Y. HATRON	1184
Chapitre 60	Purpura thrombotique thrombocytopénique, syndrome hémolytique et urémique et autres syndromes de micro-angiopathie thrombotique , par P. COPPO, A. VEYRADIER, V. FRÉMEAUX-BACCHI et É. RONDEAU, pour le Centre de référence des micro-angiopathies thrombotiques (CNR-MAT)	1226

MALADIES SYSTÉMIQUES EN PÉDIATRIE

Chapitre 61	Maladies systémiques à début pédiatrique , par P. QUARTIER et B. BADER-MEUNIER	1243
Chapitre 62	Syndromes et maladies auto-inflammatoires , par J. SIBILIA et G. GRATEAU	1278
Chapitre 63	Fièvre méditerranéenne familiale (maladie périodique) , par I. TOUITOU et I. KONÉ-PAUT	1289
Chapitre 64	Syndrome d'hyperimmunoglobulinémie D (déficit en mévalonate kinase) , par B. BADER-MEUNIER, J. SIBILIA et G. GRATEAU	1305
Chapitre 65	Pathologies auto-inflammatoires systémiques héréditaires associées à la cryopyrine , par B. NEVEN, A.-M. PRIEUR et I. KONÉ-PAUT	1309
Chapitre 66	Pathologies associées aux mutations du gène du récepteur de type 1 du TNF (TRAPS) , par J.-M. BERTHELOT, C. MASSON, Z. AMOURA et C. DODÉ	1320

AUTRES AFFECTIONS SYSTÉMIQUES

Chapitre 67	Fibroses systémiques , par C. CHAPELON-ABRIC	1335
Chapitre 68	Granulomatoses systémiques , par K. SACRÉ, B. RANQUE et T. PAPO	1347
Chapitre 69	Amyloses , par G. GRATEAU	1371
Chapitre 70	Maladie du greffon contre l'hôte , par G. SOCIÉ, R. PEFFAULT DE LA TOUR et A. JANIN	1394
Chapitre 71	Déficits immunitaires héréditaires , par J. SIBILIA, C. PICARD, L. MOUTHON et É. OKSENHENDLER	1404
Chapitre 72	Maladie de Still de l'adulte , par B. FAUTREL et J. POUCHOT	1442
Chapitre 73	Sarcoïdose , par D. VALEYRE, C. CHAPELON-ABRIC, Y. UZUNHAN et H. NUNES	1462

THÉRAPEUTIQUE

Chapitre 74	Immunosuppresseurs , par B. GODEAU et M. MICHEL	1497
Chapitre 75	Immunoglobulines intraveineuses , par Y. CRABOL, S.V. KAVERI et L. MOUTHON	1508
Chapitre 76	Hémaphérèse thérapeutique , par V. LE GUERN et L. GUILLEVIN	1525
Chapitre 77	Anti-TNF et maladies systémiques , par B. COMBE et J. MOREL	1540
Chapitre 78	Nouvelles stratégies d'immuno-intervention , par S. CANDON et L. CHATENOUD	1556
Chapitre 79	Thérapie cellulaire , par L. SENSEBÉ et A. VARIN	1579
Chapitre 80	Thérapie génique , par S. FABRE	1587
Chapitre 81	Corticothérapie , par B. TERRIER, A. BÉREZNÉ et L. MOUTHON	1609
Chapitre 82	Biothérapies	1624
	Inhibiteurs des cytokines, interleukines 6, 12 et 17, par P. MIOSEC	1624
	Les voies de co-stimulation et leurs récepteurs, par J. SIBILIA et A. CONSTANTIN	1627
	Antagonistes de l'interleukine 1, par É. HACHULLA	1646
	Anti-CD20 et autres inhibiteurs des lymphocytes B, par X. MARIETTE	1652
	Liste des principales abréviations	1667
	Index	1675

Préface

Ceux qui ont la responsabilité de l'édition de cette sixième version du *Traité des maladies (et syndromes) systémiques* et, en leur nom, Loïc Guillevin m'ont fait l'amitié et l'honneur de me demander une préface ! J'ai accepté, bien sûr, mais il faudra d'abord que le lecteur de cette préface subisse un retour sur le passé, un passé vieux de 42 ans !

La première version de cet ouvrage est en effet parue – sous ma responsabilité et celle d'André Peltier – en 1982 ! Elle comportait 33 chapitres contre 82 aujourd'hui ; 56 auteurs y avaient collaboré, trois fois plus aujourd'hui ! Parmi ces 56 auteurs, 8 seulement sont toujours présents dans cet ouvrage et y ont collaboré ! Ainsi va le temps et passe la vie !

Il serait fastidieux de passer ici en revue les avancées physiopathologiques, diagnostiques et thérapeutiques qui ont vu le jour et se sont développées depuis 40 ans ! Ces avancées ont permis de comprendre les conditions de survenue de nombre de pathologies envisagées dans cet ouvrage, de décrire certaines qui étaient complètement ignorées alors. Et surtout, de disposer de traitements nouveaux et actifs reposant notamment sur ces avancées, bien que l'on doive relever que la bonne vieille cortisone est encore présente dans nombre des chapitres de l'ouvrage !

Il serait également fastidieux de lister les concepts et les mots apparus depuis 40 ans ! En faisant le vœu pieux que le français ne soit pas trop maltraité et utilisé correctement chaque fois que la chose est possible, ce qui malheureusement est loin d'être le cas dans nombre de publications médicales ! Le « conventionnel » à la place de classique, le « contrôle » à la place de témoin sont deux exemples qui irritent, à juste titre, les vieux défenseurs de la langue française ! Même si, comme nous l'avons avoué dès 1982, il devenait difficile d'échapper à l'impropre adjectif « systémique » présent jusqu'à ce jour ! Parfois se forment des couples illégitimes comme le tout récent « netose » fruit des amours de l'anglais pour « filet » et de la désinence gauloise en « ose » !

Autre évocation de 1982 : nous nous interrogeons dans la préface de l'époque sur le destin des gros traités de médecine et de la concurrence prévisible de l'informatique sous toutes ses formes ! Nous comparions ces ouvrages aux gros animaux préhistoriques dont la disparition – de cause encore discutée – fit place aux mammifères et finalement à l'*Homo* (dit) *sapiens*. Qu'en est-il aujourd'hui ? La réponse à cette interrogation est – au moins en partie – la publication en 2015 de cet ouvrage ! Mais une première concession est apparue : le volume des références qui a enflé au fil des années et des éditions successives a imposé que l'électronique vienne en renfort de la page imprimée. De plus, ce recours – outre qu'il va épargner quelques arbres de nos forêts – permettra peut-être – du moins je l'espère – de satisfaire un vœu que j'avais exprimé dans la préface de l'édition précédente et que je renouvelle ici : que l'électronique permette entre deux rééditions de l'ouvrage imprimé d'adresser à son utilisateur les compléments, nouveautés, progrès thérapeutiques et diagnostiques, qu'il est urgent de leur faire connaître !

Ainsi cette préface qui donc associe des souvenirs nostalgiques et des vœux pieux pourra avoir une modeste utilité pour des utilisateurs, notamment les jeunes que je souhaite aussi nombreux qu'ils le furent pour les précédentes éditions !

Marcel-Francis KAHN

Avant-propos

Une nouvelle édition du *Traité des maladies et syndromes systémiques* est un événement éditorial pour nombre d'internistes, rhumatologues, immunologistes et pour de nombreux autres médecins spécialistes, passionnés par ces maladies complexes dont l'expression clinique est souvent déroutante, le diagnostic difficile, la pathogénie et le traitement complexes. Comme le souligne M.-F. Kahn dans sa préface, la taille de l'ouvrage a augmenté au fil des décennies, traduisant essentiellement le progrès médical, qu'il s'agisse de comprendre les mécanismes des maladies ou de l'arrivée de nouveaux traitements. Cette édition marque aussi un tournant dans l'évolution de l'ouvrage car, dans un délai proche, des mises à jour seront disponibles sur un site web réservé à cet effet, permettant de suivre au plus près les évolutions prévisibles de la Médecine. L'internet permettra aussi d'introduire une iconographie encore plus riche, des documents de référence, des liens utiles et des vidéos.

Le *Traité* est un ouvrage de référence « vivant » qui évolue au fil du progrès médical. Les nombreux auteurs et rédacteurs de section qui ont préparé cette nouvelle édition ont apporté les données les plus complètes et les plus récentes, situant ainsi ce livre parmi ceux que tout médecin hospitalier et de nombreux étudiants devraient avoir dans leur bibliothèque.

Loïc GUILLEVIN
Olivier MEYER
Éric HACHULLA
Jean SIBILIA

PATHOGÉNIE : GÉNÉRALITÉS

EXPLORATION DE L'IMMUNITÉ HUMORALE ET CELLULAIRE

1 —

François TRON, Olivier BOYER et Serge JACQUOT

Le système immunitaire et ses mécanismes effecteurs sont fréquemment impliqués dans la physiopathologie des maladies systémiques, qu'il s'agisse de manifestations relevant d'une hypersensibilité faisant intervenir les auto-anticorps, les complexes immuns ou les cellules T ou de manifestations associées aux déficits en immunoglobulines (Ig) ou aux maladies lymphoprolifératives. L'exploration du système immunitaire est donc souvent mise en œuvre au cours des maladies systémiques. Elle peut être conduite avec l'objectif de rechercher les anomalies immunologiques permettant d'établir un diagnostic, de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques en cause en identifiant les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des manifestations observées ou encore de suivre un traitement immunosuppresseur ou immunomodulateur. Classiquement, l'étude du système immunitaire comporte l'exploration de l'immunité humorale et de l'immunité cellulaire. Nous préférons cependant présenter les modalités d'exploration du système immunitaire en regroupant les méthodes d'analyse du compartiment lymphocytaire B puis celles du compartiment lymphocytaire T au cours des maladies systémiques, avant de présenter les stratégies utilisées en fonction de la recherche du mécanisme physiopathologique en cause.

Exploration du compartiment lymphocytaire B

Le lymphocyte B naît de la cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse et y poursuit sa différenciation. Au cours de ce processus surviennent deux grands événements : le réarrangement de l'ADN germinale au niveau des locus codant la chaîne lourde et les chaînes légères et la tolérance centrale contrôlant le passage à la périphérie de clones lymphocytaires B autoréactifs. Les mécanismes de réarrangement font que chaque lymphocyte B acquiert un programme génétique unique qui ne lui permet de sécréter qu'une seule variété structurale d'Ig spécifique d'un seul déterminant antigénique. Ces mécanismes sont aussi à l'origine de la diversité du répertoire d'immunoglobulines capables de réagir avec environ 10^9 déterminants antigéniques différents. Ce répertoire lymphocytaire B théoriquement illimité peut reconnaître non seulement les antigènes exogènes, mais aussi les antigènes du soi. Le contrôle du répertoire autoréactif s'opère au niveau de la cellule B immature. Les lymphocytes B matures sélectionnés gagnent les organes lymphoïdes périphériques. Lorsque l'antigène est introduit dans l'organisme, il sélectionne le clone porteur de la molécule d'immunoglobulines qui lui est spécifique et induit, avec l'aide des cellules T du paracortex (pour les antigènes thymo-dépendants), la prolifération et la poursuite de la différenciation lymphocytaire en plasmocytes sécréteurs d'IgM. Certains lymphocytes gagnent le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires où surviennent les mutations somatiques,

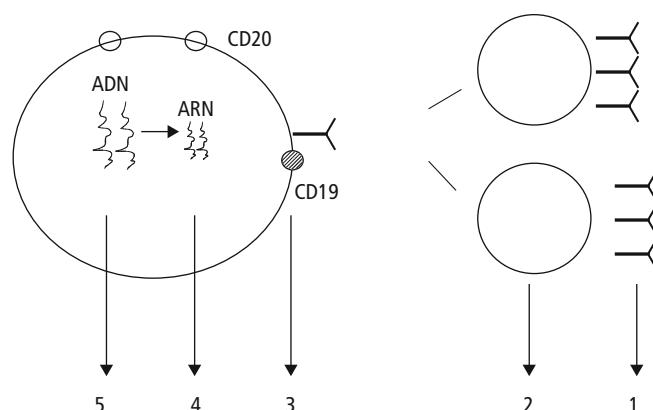


Figure 1-1 Les différents niveaux d'étude des lymphocytes B. (1) Étude des propriétés quantitatives et qualitatives des molécules d'immunoglobulines. (2) Étude des fonctions du lymphocyte B (prolifération et capacité de sécrétion des molécules d'immunoglobulines). (3) Étude phénotypique des lymphocytes B. (4) Étude du lymphocyte B au niveau des ARNm. (5) Étude du lymphocyte B au niveau de l'ADN.

la commutation de classe et la sélection des lymphocytes B spécifiques de l'antigène associée à la contre-sélection des lymphocytes auxquels les mutations somatiques ont pu conférer une spécificité différente, notamment dirigée contre un antigène du soi. Au stade ultime de la différenciation, le lymphocyte B devient soit un plasmocyte sécréteur de molécules d'immunoglobulines de classe G, A ou E, soit un lymphocyte B mémoire.

L'exploration du compartiment lymphocytaire B peut donc se faire à différents niveaux (Figure 1-1).

Méthodes d'analyse des immunoglobulines

Électrophorèse des protéines du sérum

L'étude de la migration des immunoglobulines dans un champ électrique par l'électrophorèse des protéines du sérum montre leur diversité structurale (Figure 1-2). L'analyse du tracé montre que la bande de l'albumine est étroite et clairement délimitée, alors que la bande protéique contenant les immunoglobulines et connue sous le terme de gammaglobulines est large et diffuse. Cette absence apparente de résolution est liée à la présence de nombreuses molécules d'immunoglobulines, de mobilité électrophorétique différente. Cette mobilité électrophorétique de distribution gaussienne est liée aux petites différences dans la composition des résidus d'acides aminés des immunoglobulines synthétisées par les individus normaux, donnant le classique profil

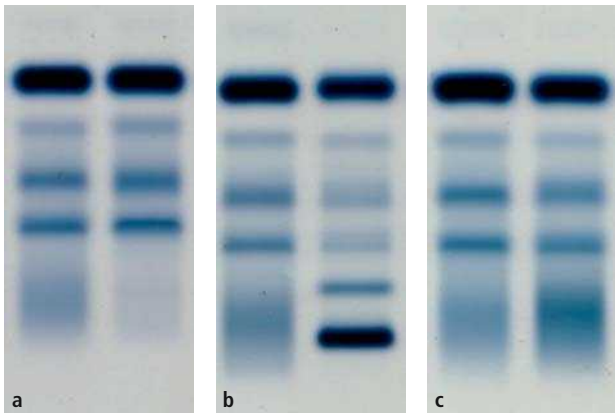


Figure 1-2 Analyse électrophorétique des protéines du sérum dans un gel d'agarose. a) Profil électrophorétique normal et hypogammaglobulinémie. b) Profil normal et présence d'une protéine monoclonale ; la bande protéique correspondant à l'immunoglobuline monoclonale a deux caractéristiques : elle est étroite et ses bords sont parfaitement bien limités. Cette bande étroite traduit la présence en quantité anormale d'une immunoglobuline ayant les mêmes caractéristiques structurales et donc la même mobilité électrophorétique. c) Hypergammaglobulinémie polyclonale. (Documents dus au Dr Muriel Quillard.)

électrophorétique polyclonal. L'électrophorèse des protéines du sérum permet une première évaluation des modifications quantitatives (hyper- ou hypogammaglobulinémie) et qualitatives (hypergammaglobulinémie monoclonale) de la production des Ig (voir Figure 1-2).

Immunofixation

L'immunofixation a aujourd'hui remplacé l'immuno-électrophorèse pour rechercher et identifier une immunoglobuline monoclonale. L'étape initiale consiste à séparer les protéines du sérum dans des pistes d'électrophorèse placées en parallèle dans un gel d'agarose. Après la séparation des protéines et avant leur coloration, chacune des six pistes du gel est incubée avec un antiserum spécifique soit de l'ensemble des protéines du sérum, soit d'une classe d'immunoglobulines, soit d'une chaîne légère. L'antisé-

rum pénètre dans le gel, interagit avec les protéines dont il est spécifique et forme un précipité lorsque le rapport antigènes/anticorps est à l'équivalence. Après lavage qui élimine les protéines non précipitées, les complexes antigène/anticorps sont colorés au bleu de Coomassie (Figure 1-3). Le tableau 1-I résume les principales indications d'une analyse par immunofixation des protéines du sérum. La mise en évidence d'une immunoglobuline monoclonale doit conduire à rechercher une chaîne légère dans les urines par la pratique d'une immunofixation des protéines urinaires et la mise en évidence d'une protéine de Bence-Jones.

Tableau 1-I Principales indications de l'exploration quantitative et qualitatives des immunoglobulines.

<i>Indications d'une analyse par immunofixation du sérum</i>	
Caractériser une immunoglobuline monoclonale détectée sur l'électrophorèse	
Identifier une immunoglobuline monoclonale présente en quantité insuffisante pour être détectée sur l'électrophorèse des protéines du sérum	
Rechercher une chaîne légère monoclonale devant une hypogammaglobulinémie	
Présence d'une amylose primitive	
<i>Indications du dosage quantitatif des immunoglobulines</i>	
Présence d'une hypogammaglobulinémie à l'électrophorèse des protéines du sérum	
Présence d'une immunoglobuline monoclonale à l'électrophorèse des protéines du sérum	
Infections bactériennes récurrentes	
Maladie à IgG ₄	
<i>Indications du dosage des sous-classes d'IgG</i>	
Déficit en IgG	
Déficit en IgA	
Maladie à IgG ₄	
Infections bactériennes récurrentes en l'absence de déficit en immunoglobulines	
<i>Indications du dosage des IgA</i>	
Infections bactériennes récurrentes	
Maladies auto-immunes (maladie cœliaque, etc.), déficit en IgA	
<i>Indications du dosage des IgE</i>	
Déficits immunitaires	
Suspicion de syndrome d'hyper-IgE	
Atopie	
Infections parasitaires	
<i>Indications du dosage des IgD</i>	
Suspicion de syndrome d'hyper-IgD	

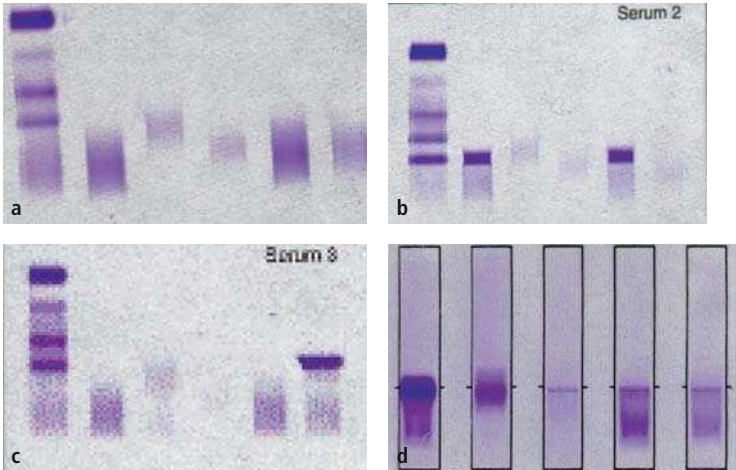


Figure 1-3 Analyse des protéines du sérum et des immunoglobulines par la technique d'immunofixation. Dans les trois gels (a), (b) et (d), les six pistes sont incubées, de gauche à droite, avec un antiserum antiprotéines totales, antichaîne lourde γ , antichaîne lourde α , antichaîne lourde μ , antichaîne légère κ et antichaîne légère λ . a) Sérum normal. b) Présence d'une IgG κ monoclonale ; il existe une bande étroite précipitée par les antisérums anti- μ et anti- κ de même aspect et de même mobilité électrophorétique. c) Présence d'une chaîne légère λ , il existe une bande étroite précipitée par l'antisérum anti- λ et non précipitée par les antisérums anti- γ , anti- α , anti- μ ou anti- κ . d) Maladie des chaînes lourdes γ . Seules cinq pistes sont montrées, correspondant de gauche à droite à un antiserum anti- γ , anti- α , anti- μ , anti- κ et anti- λ . Il existe une bande étroite précipitée uniquement par l'antisérum anti- γ .

Dosage quantitatif des classes et sous-classes d'immunoglobulines

La molécule d'immunoglobuline est constituée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères identiques deux à deux. Il existe cinq classes de chaînes lourdes γ , α , μ , δ et ϵ et deux types de chaînes légères κ et λ . Chaque ensemble de chaînes lourdes est associé à un ensemble de chaînes légères, conduisant à plusieurs formules moléculaires pour les IgG ($\gamma_2, \kappa_2 ; \gamma_2, \lambda_2$), les IgM ($\mu_2, \kappa_2 ; \mu_2, \lambda_2$), les IgA ($\alpha_2, \kappa_2 ; \alpha_2, \lambda_2$), etc. Les IgG, IgD et IgE sont toujours présentes sous forme monomérique, les IgA et les IgM sous forme multimérique. Chez l'adulte normal, la concentration des IgG sériques est comprise entre 800 et 1 400 mg/dl. Les différences en acides aminés des domaines constants de la chaîne lourde des IgG permettent de séparer celles-ci en quatre sous-classes : IgG₁ (66 p. 100 des IgG), IgG₂ (23 p. 100), IgG₃ (7 p. 100) et IgG₄ (4 p. 100). Les IgA sont présentes dans le sérum à la concentration de 0,7 à 3,4 mg/dl et constituent la principale classe d'Ig des liquides sécrétoires où elles existent sous forme de dimère associé à la chaîne J et au composant sécrétoire qui est sécrété par les cellules de la muqueuse épithéliale et permet le transport des IgA du pôle basal de la cellule épithéliale vers son pôle apical. Les molécules d'IgM sont composées de cinq sous-unités monomériques liées entre elles par des ponts disulfures et par la chaîne J (structure pentamérique). La concentration sérique des IgM est comprise entre 0,5 et 2,1 g/l. L'IgD est un composant mineur du sérum dont la concentration est d'environ 0,03 g/l. L'IgE est présente dans le sérum à la concentration la plus faible (17-450 ng/ml). Les taux des immunoglobulines de classes G, A et M sont le plus souvent déterminés par néphélométrie et celui des IgE par une technique ELISA, de même que les IgD. La détermination du taux des sous-classes d'IgG se fait par technique ELISA et nécessite l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques des déterminants antigéniques portés par les chaînes lourdes $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ ou γ_4 . Il s'agit d'une technique délicate devant prendre en compte le taux global d'immunoglobulines de classe G. La concentration des sous-classes d'IgG varie avec l'âge et, en outre, ne suit pas une distribution normale dans la population. Par exemple, 30 p. 100 des sujets adultes de sexe féminin ont des taux indétectables d'IgG₄. Le tableau 1-I précise les indications du dosage des sous-classes d'IgG.

Recherche et identification des cryoglobulines

Les cryoglobulines sont des Ig sériques qui précipitent au froid et se redissolvent à 37 °C. La recherche d'une cryoglobuline comporte trois étapes : le dépistage, le dosage et l'identification. Le dépistage d'une cryoglobuline impose des conditions strictes de prélèvement et de recueil du sang sur un tube sec qui doit être placé à 37 °C et, après rétraction du caillot, centrifugé à cette même température. Le sérum est ensuite transféré dans des tubes longs et étroits (classiquement tube de Veillon) et conservé à +4 °C pendant 8 jours, délai nécessaire pour détecter les cryoglobulines de faible quantité. Le dosage de la cryoglobuline se fait le plus souvent en déterminant directement la quantité de protéines présentes dans le précipité et en rapportant ensuite la quantité obtenue au volume initial du sérum prélevé. L'identification de la cryoglobuline permet de la classer dans l'un des trois types proposés par Brouet et al. [1] et est indispensable pour en apprécier la signification clinique. Elle se fait aujourd'hui par la technique d'immunofixation (Figure 1-4).

Les cryoglobulines de type I sont constituées uniquement d'une Ig monoclonale de classe G, M ou A porteuse de l'un des deux types de chaînes légères (voir Figure 1-4). Ces cryoglobulines sont associées aux affections comportant la production d'une Ig monoclonale.

Les cryoglobulines de type II sont mixtes, et comportent une Ig monoclonale, le plus souvent une IgM κ , et des composants polyclonaux

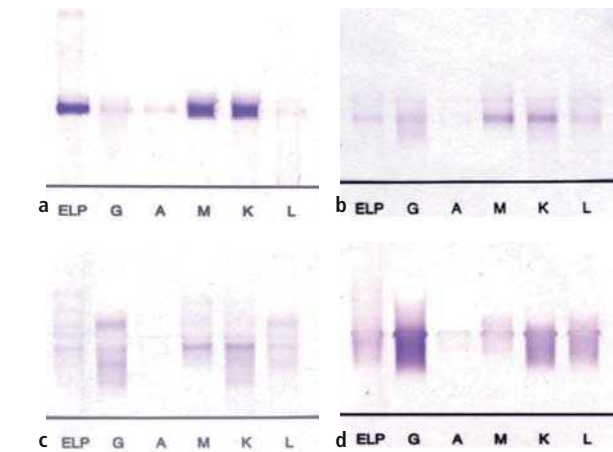


Figure 1-4 Analyse des différents types de cryoglobulines par la technique d'immunofixation. a) Cryoglobuline de type I, IgM κ : une bande étroite de même aspect et de même mobilité est immunoprécipitée par les antisérums anti- μ et anti- κ . b) Cryoglobuline de type II comportant une Ig monoclonale IgM κ , des IgG et des IgA polyclonales associées à des chaînes légères κ et λ . c) Cryoglobuline de type II comportant plusieurs composants monoclonaux IgG λ et IgM κ . d) Cryoglobuline de type III composée d'IgM $\kappa\lambda$, d'IgG $\kappa\lambda$ et d'IgA $\kappa\lambda$ polyclonales. G, A, M, K et L indiquent les antisérums utilisés.

IgM $\kappa\lambda$, IgG $\kappa\lambda$ et IgA $\kappa\lambda$. L'IgM monoclonale a une activité facteur rhumatoïde, c'est-à-dire dirigée contre le fragment Fc des IgG polyclonales. Les cryoglobulines de type II s'accompagnent fréquemment de la positivité dans le sérum des tests au latex et de Waaler-Rose et d'une consommation du C4 qui toutefois semble survenir in vitro. Les cryoglobulines de type II peuvent cependant être de composition différente, renfermant par exemple plusieurs composants monoclonaux (voir Figure 1-4) ou un composant monoclonal de classe IgG κ ou IgG λ . Les cryoglobulines de type II sont fréquemment observées au cours de l'infection par le VHC (Tableau 1-II). La mise en évidence d'un composant monoclonal est un élément cardinal, car il témoigne de l'expansion anormale d'un clone lymphocytaire B, ce qui peut justifier la poursuite des explorations complémentaires, notamment la recherche d'une maladie lymphoproliférative.

Tableau 1-II Maladies associées aux différents types de cryoglobulines.

Maladie		Cryoglobulines	
Hémopathies malignes			
Myélome	}	Types I et II	
LLC			
Lymphome			
Maladie des agglutinines froides			
Maladies infectieuses			
Virales	VHC	}	Types II et III
	VHB		
	CMV		
	EBV		
Bactériennes	Endocardites	}	Type III
	Lèpre		
	GNA		
Parasitaires	Schistosomiase	}	Type III
	Paludisme		
Maladies auto-immunes		Type III	

CMV : cytomégalovirus ; EBV : virus d'Epstein Barr ; GNA : glomérulonéphrite aiguë ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; VHB : virus de l'hépatite B ; VHC : virus de l'hépatite C.

Tableau 1-III Indications de la recherche de cryoglobuline.

Suspicion d'une maladie à complexes immuns
Manifestations cliniques évoquant une vascularite
Manifestations cliniques cutanées déclenchées par le froid
Présence d'une protéine monoclonale
Infections virales chroniques, notamment à VHC

Les cryoglobulines de type III sont mixtes et polyclonales, ne comportant aucun composant monoclonal. Elles peuvent être constituées d'IgM, d'IgG et d'IgA. Leur taux est souvent faible, inférieur à 1 g/l. Ici encore, les cryoglobulines de type III peuvent être associées à la positivité des tests au latex et de Waaler-Rose, témoignant de l'activité anti-IgG des IgM polyclonales. Le tableau 1-II montre les principales affections associées à la présence d'une cryoglobuline de type III.

Les cryoglobulines peuvent être responsables de manifestations cliniques et doivent être recherchées dans les situations pathologiques indiquées dans le tableau 1-III.

Analyse de la fonction anticorps
des immunoglobulines

PRINCIPALES TECHNIQUES DE DÉTECTION DES ANTICORPS • **Immunofluorescence indirecte (IFI)** La technique d'IFI est utilisée pour détecter les anticorps spécifiques d'antigènes cellulaires ou tissulaires. Elle consiste à incuber le sérum du malade avec des coupes de

tissus animaux ou humains ou des cellules préalablement fixées à l'alcool ou l'éthanol, ce qui permet la pénétration intracellulaire des anticorps. Après incubation, les coupes sont lavées et les protéines du sérum et les anticorps non fixés sont éliminés. La coupe est incubée avec des anticorps secondaires marqués par un fluorochrome pour révéler la fixation des anticorps primaires spécifiques des antigènes de tissus ou de cellules. Ces anticorps secondaires peuvent être spécifiques des différents isotypes d'immunoglobulines humaines. L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est le fluorochrome le plus souvent utilisé. Le FITC est excité par une lumière incidente d'une longueur d'onde comprise entre 450 et 500 nm et émet une lumière fluorescente de plus faible énergie ayant une longueur d'onde comprise entre 500 et 550 nm (jaune-vert) qui est sélectionnée par les filtres du microscope et transmise aux objectifs qui en permettent la visualisation. L'IFI est une technique semi-quantitative dont les résultats sont exprimés en titre. Sa sensibilité permet la détection d'anticorps spécifiques à la concentration d'environ 0,1 µg/ml. La technique nécessite la caractérisation de chacun des réactifs, plus particulièrement des antisérums secondaires et doit, pour chaque test, inclure des contrôles négatif et positif. Elle est largement utilisée pour rechercher des anticorps dirigés contre des antigènes bactériens ou viraux au cours des maladies infectieuses et des auto-anticorps au cours des maladies auto-immunes. Elle n'implique pas l'identification et la caractérisation moléculaire de l'antigène reconnu, mais permet de décrire un aspect de la fluorescence qui oriente vers la spécificité des auto-anticorps. Il s'agit donc d'une technique de dépistage d'une réactivité globale vis-à-vis des antigènes du tissu ou de la cellule utilisés comme substrats (Figure 1-5).

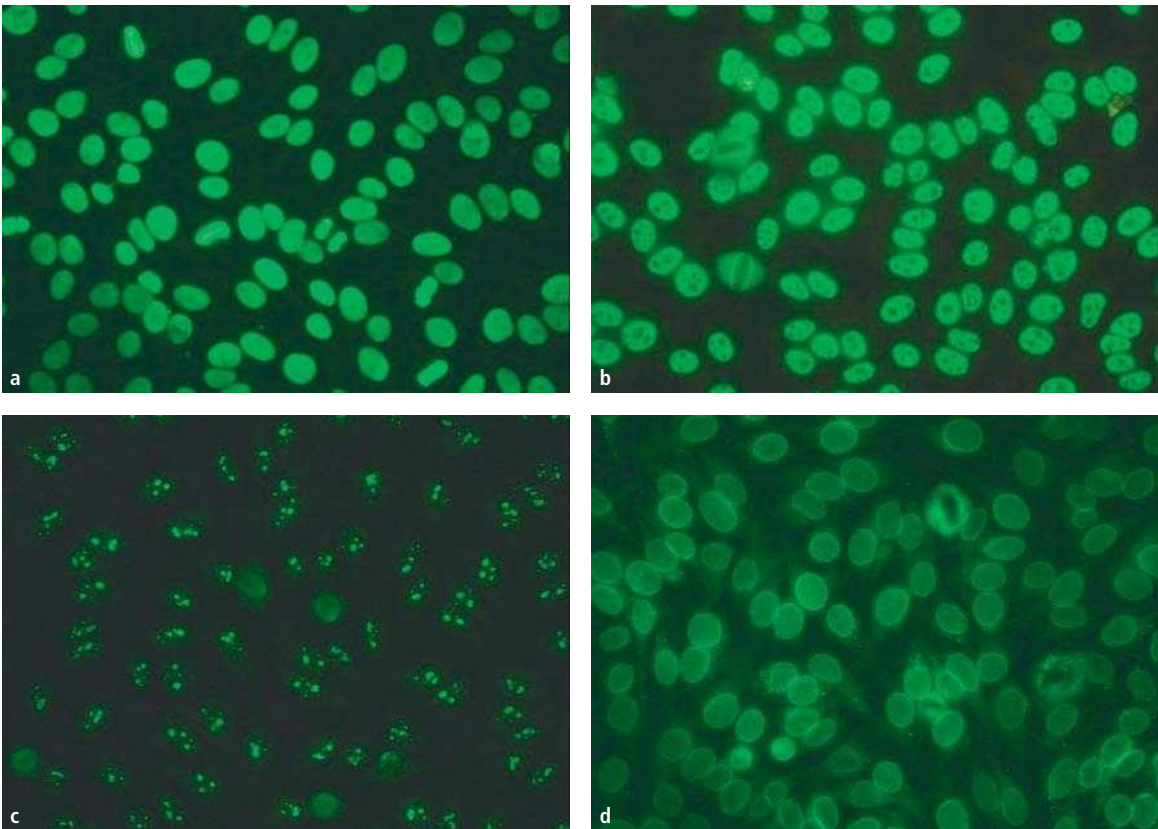


Figure 1-5 Analyse en immunofluorescence indirecte sur des cellules HEP-2 des sérums de malades atteints de maladies auto-immunes non spécifiques d'organe (agrandissement × 400). Les auto-anticorps présents dans le sérum des malades sont incubés avec les cellules HEP-2 étalées sur la lame, fixées et perméabilisées avec de l'éthanol. L'antisérum utilisé est un sérum de lapin polyclonal anti-IgG humaines et marqué par le FITC. a) Aspect nucléaire et homogène de la fluorescence, correspondant à la présence d'anticorps antinucléosome. b) Aspect nucléaire et moucheté de la fluorescence, correspondant à la présence d'anticorps anti-antigènes nucléaires solubles. c) Aspect nucléolaire de la fluorescence, correspondant à la présence d'anticorps anti-ScI70. d) Aspect nucléaire et de la membrane nucléaire de la fluorescence, correspondant à la présence d'anticorps antilamine. (Documents dus au Dr Fabienne Jouen.)

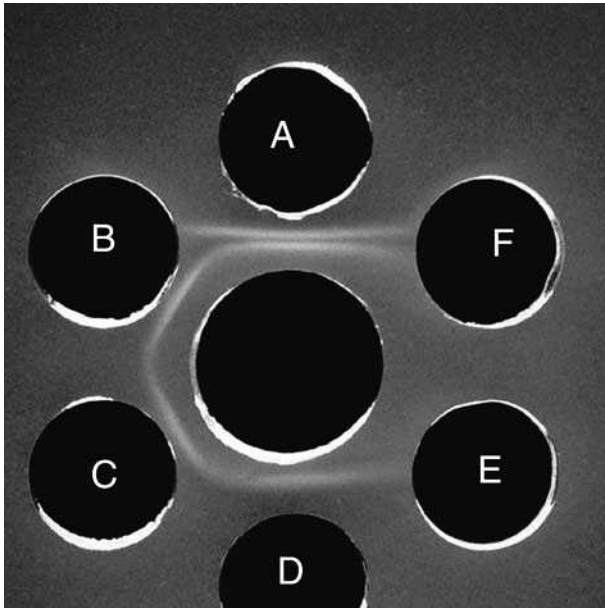
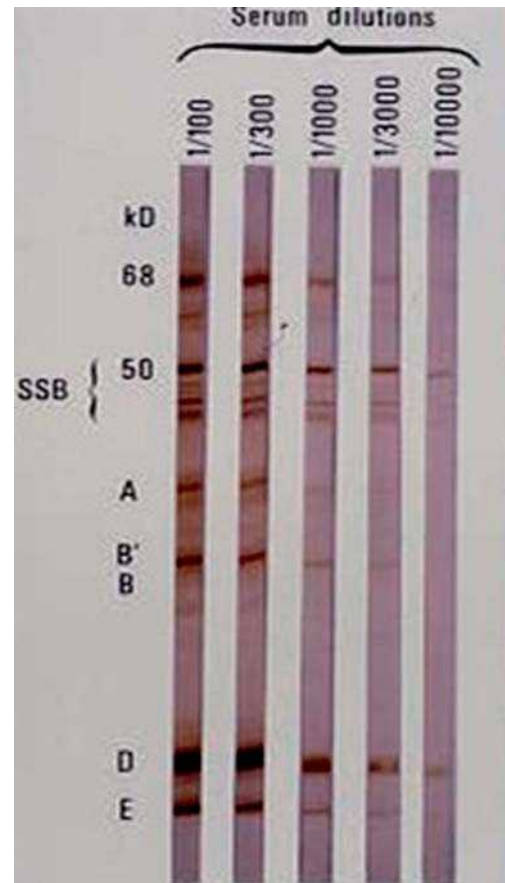


Figure 1-6 Mise en évidence d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles par la technique de double immunodiffusion en gel dans les sérums de malades atteints de LES. Un extrait soluble d'antigènes nucléaires est introduit dans le puits central. Les sérums des malades atteints de lupus A, C, E et F et les sérums de référence B et D sont introduits dans les puits périphériques. Une réaction de précipitation est observée au niveau des puits A, B, C et D. Une réaction d'identité est observée entre les arcs de précipitation des puits A, B, C et D. Au niveau du puits A, il existe deux arcs de précipitation séparés, ne donnant pas lieu à une réaction d'identité et correspondant à deux populations d'auto-anticorps reconnaissant des antigènes différents.

Techniques de précipitation Elles sont fondées sur une réaction antigène-anticorps au cours de laquelle un antigène multivalent réagit avec les anticorps, soit dans la phase fluide, soit dans une phase semi-solide telle qu'un gel d'agarose pour former un réseau insoluble de complexes antigène-anticorps. Les réactions de double immunodiffusion en gel (Ouchterlony) sont encore fréquemment utilisées, notamment pour détecter la présence d'auto-anticorps dirigés contre des extraits d'antigènes cellulaires (Figure 1-6). La précipitation survient pour un rapport particulier de concentration d'antigènes et d'anticorps appelé point d'équivalence. La technique de double immunodiffusion a en outre l'avantage, par l'examen de l'aspect des lignes de précipitation et l'utilisation de sérums de référence, de définir la spécificité des anticorps donnant une réaction de précipitation.

Immuno-empreinte ou Western-blot La première étape d'une analyse en Western-blot consiste à extraire les protéines du substrat cellulaire ou d'un agent pathogène qui sont la cible des anticorps. Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire dans un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS). Les protéines sont ensuite transférées et immobilisées sur un support solide semi-perméable telle qu'une feuille de nitrocellulose, puis celle-ci est incubée avec le sérum et, après lavage, avec les anticorps secondaires marqués par une enzyme. Après réaction avec le substrat de l'enzyme, les protéines reconnues apparaissent sous forme de bandes dont la masse moléculaire peut être estimée par rapport à des standards de masse moléculaire inclus dans le gel de polyacrylamide et transférés sur la feuille de nitrocellulose. Le nombre et l'inten-



Anti-Sm	7	5,1	3,2	2,3	< 1
Anti-RNP	4	3	1,6	< 1	< 1
Anti-SS-B (La)	4,4	3,2	1,6	1,2	< 1

Figure 1-7 Analyse par immuno-empreinte d'un extrait nucléaire avec un mélange de sérums de malades atteints de LES. Les protéines ont été extraites d'une lignée cellulaire HL60, séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Celle-ci est incubée avec les sérums des malades dont les anticorps fixés sont révélés avec un antisérum anti-immunoglobulines humaines. Ici, on observe une réactivité vis-à-vis de polypeptides de masse moléculaire de : 68-30 kDa (A), 28-27 kDa (B-B'), correspondant à une réactivité anti-RNP complète ; 52 kDa, correspondant à une réactivité anti-SS-B (La) ; 16 et 12 kDa, correspondant à une réactivité anti-Sm. Les différentes pistes correspondent à différentes dilutions.

sité des bandes dépendent du nombre d'antigènes reconnus et de la concentration des anticorps du sérum (Figure 1-7).

Tests immuno-enzymologiques Les tests ELISA sont les plus fréquemment utilisés pour la recherche d'anticorps [9]. Le principe de l'ELISA est décrit dans la figure 1-8. Cette technique offre de nombreux avantages : elle est plus sensible que les techniques d'IFI et d'immunoprécipitation, permettant la détection d'anticorps à la concentration de 1-10 ng/ml ; elle permet une mesure semi-quantitative des anticorps spécifiques grâce à l'établissement d'une courbe standard calibrée en unités ; les variabilités inter-essais et inter-laboratoires sont le plus souvent limitées. Les techniques immuno-enzymologiques supposent que l'antigène qui est la cible des anticorps ait été identifié et purifié pour être adsorbé sur la phase solide. Cette

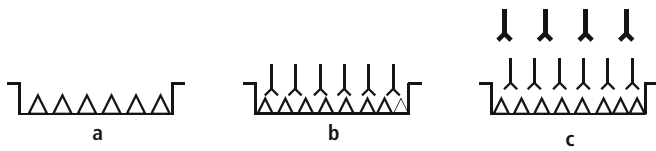


Figure 1-8 Principe d'un test ELISA. a) L'antigène (Δ) est fixé de façon non covalente à un support solide tel que les puits d'une microplaque de plastique. La nature du support dépend des caractéristiques chimiques de l'antigène et a aussi pour objectif de diminuer la liaison non spécifique des immunoglobulines. b) L'incubation du sérum testé permet la fixation des anticorps spécifiques à l'antigène fixé sur le support solide (I). c) Après lavage, un antisérum polyclonal ou un anticorps monoclonal anti-immunoglobulines humaines marqués avec une enzyme (I) est ajouté aux puits. L'étape finale du test ELISA consiste à évaluer la quantité de produit coloré générée par l'addition du substrat de l'enzyme.

technique se situe donc en aval des techniques d'IFI qui, rappelons-le, permettent la détection d'une réactivité tissulaire ou cellulaire et des techniques d'immuno-empreinte en PAGE-SDS qui permettent la caractérisation de la masse moléculaire du polypeptide reconnu par les anticorps.

DÉVELOPPEMENT DES STRATÉGIES DE DÉTECTION DES ANTICORPS • Identification de nouvelles populations antigènes-anticorps

Deux techniques permettent l'identification de nouvelles populations d'auto-anticorps, c'est-à-dire l'identification de l'antigène cible. La première est l'immunocriblage de banque d'expression d'ADNc préparée à partir des ARNm extraits du substrat cellulaire exprimant l'antigène et construite dans *Escherichia coli* (Figure 1-9).

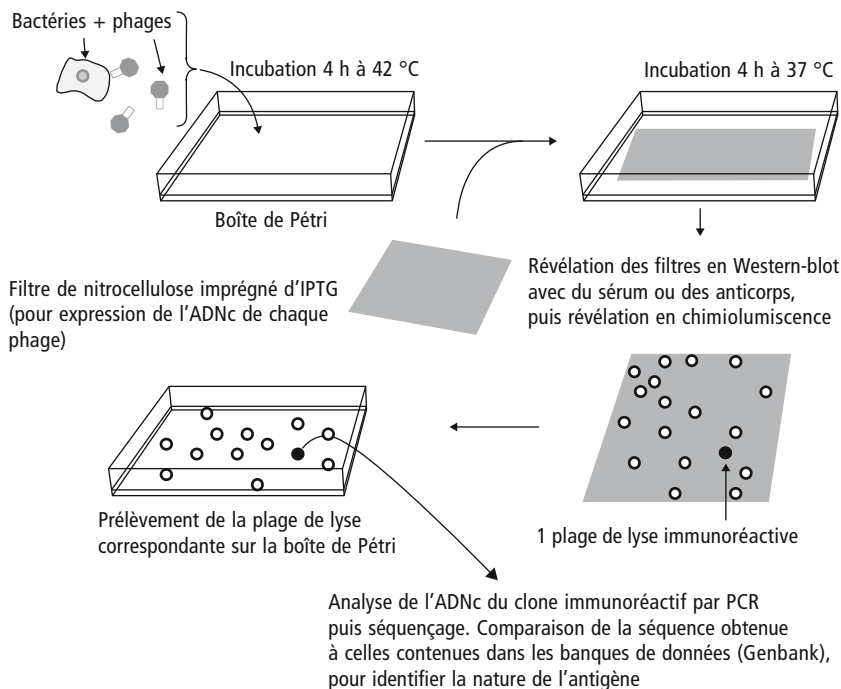


Figure 1-9 Immunocriblage d'une banque d'expression d'ADNc. La technique consiste à extraire les ARNm du substrat cellulaire exprimant l'antigène cible, puis à transcrire les ARNm en ADNc. Les ADNc sont clonés dans des vecteurs d'expression (λ gt11) qui sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes. Celles-ci sont étalées sur une boîte de culture et synthétisent la protéine correspondante à l'ADNc transfecté. Le criblage des replica des clones bactériens avec le sérum du malade permet l'identification du clone sécrétant la protéine cible. L'isolement, puis l'expansion du clone bactérien permettent l'extraction du phage, le séquençage de l'ADNc et, in fine, l'identification de l'antigène correspondant.

Une deuxième technique est l'immunocriblage d'une carte protéomique de la lignée cellulaire contenant l'antigène cible, suivie de l'identification de la protéine immunoréactive par spectrométrie de masse (Figure 1-10).

Approche diagnostique multiparamétrique Cette approche est fondée sur la constatation que les réponses anticorps survenant au cours d'une maladie infectieuse, inflammatoire ou auto-immune, sont dirigées le plus souvent contre de nombreux antigènes. La réactivité de la réponse anticorps vis-à-vis des antigènes cibles permet l'établissement d'un profil dont la valeur diagnostique peut être supérieure à celle apportée par l'étude d'une seule population d'anticorps [3]. En outre, la réactivité vis-à-vis d'un ensemble d'antigènes permet, par exemple au cours d'une manifestation pathologique pouvant relever de différentes maladies, telles qu'un rhumatisme inflammatoire persistant, de déterminer quels sont les auto-antigènes reconnus ou non reconnus et d'établir ainsi un profil spécifique d'une maladie donnée. Il est ainsi possible de créer des puces ou *micro-arrays* d'antigène pour un grand nombre de maladies allergiques ou auto-immunes (Figure 1-11).

ÉVALUATION ET DÉTECTION DES ANTICORPS SPÉCIFIQUES •

Anticorps dirigés contre les xéno-antigènes Un excellent moyen d'évaluer la capacité fonctionnelle du compartiment lymphocytaire B est d'étudier la réponse in vivo à une stimulation antigénique par des antigènes thymo-dépendants ou thymo-indépendants. La stratégie consiste à mesurer la concentration d'anticorps spécifiques avant et après immunisation, en considérant qu'une augmentation du taux d'anticorps 4 fois supérieure à celui observé avant l'immunisation est le reflet d'un fonctionnement normal du compartiment lymphocytaire B. L'étude des réponses anticorps vis-à-vis de

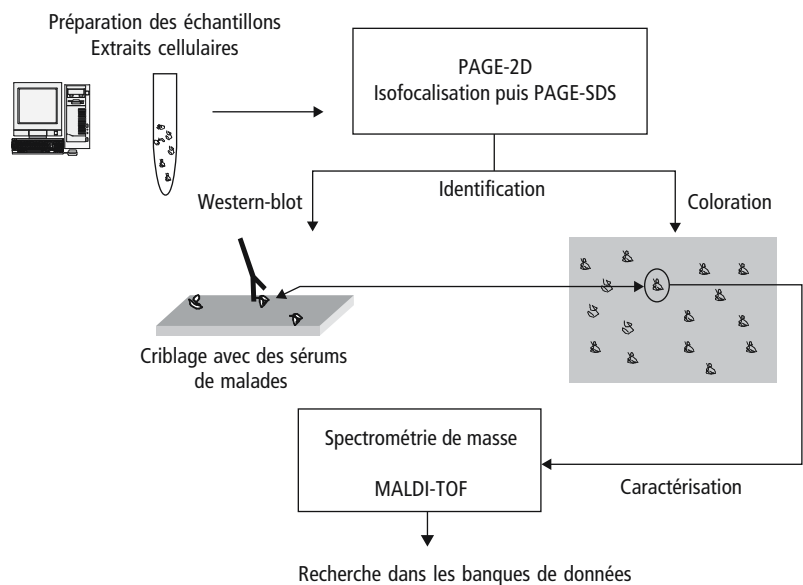


Figure 1-10 Immunocriblage d’une carte protéomique préparée à partir du substrat cellulaire exprimant l’auto-antigène. La technique consiste, lorsque les anticorps reconnaissent un antigène protéique, par exemple, en immuno-empreinte d’un extrait cellulaire séparé par PAGE-SDS, à séparer l’extrait cellulaire par électrophorèse bidimensionnelle qui combine une première séparation selon le point iso-électrique et une seconde séparation selon la masse moléculaire. Un replica de la carte protéomique est obtenu sur une feuille de nitrocellulose (empreinte) qui est ensuite incubée avec le sérum étudié. La protéine immunoréactive est visualisée sur le replica, repérée sur le gel de polyacrylamide, excisée, digérée par la trypsine et analysée par spectrométrie de masse.

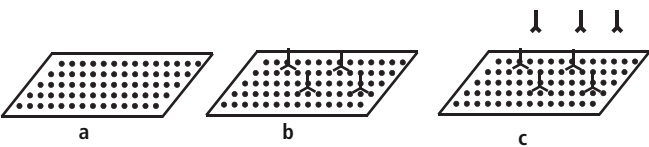


Figure 1-11 Principes des puces à protéines dédiées à l’analyse des réponses auto-immunes. Un *micro-array* est composé (a) d’une large collection d’antigènes connus (protéines, lipides, antigènes polysaccharidiques, peptides linéaires) qui, en une seule étape (b), sont fixés par les anticorps présents dans le sérum étudié (c) et, après lavage, l’addition d’un antiserum anti-immunoglobuline humaine permet d’établir un profil de reconnaissance caractéristique.

l’anatoxine tétanique ou de l’anatoxine diphtérique est la méthode la plus utile pour évaluer la réponse vis-à-vis des antigènes T-dépendants. L’évaluation de la réponse vis-à-vis des antigènes polysaccharidiques thymo-indépendants se fait par l’administration d’un vaccin pneumococcique. L’absence de réponse aux antigènes vaccinaux s’observe au cours des déficits immunitaires héréditaires, acquis ou induits. L’absence de réponse aux antigènes polysaccharidiques peut aussi s’observer au cours des déficits en IgG₂ et IgG₄ ou chez des patients n’ayant pas de déficit quantitatif en Ig, comme cela a été décrit au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren ou chez des sujets présentant des infections bactériennes à répétition.

Évaluation de la réponse vis-à-vis des allo-antigènes Il s’agit d’anticorps naturels présents chez des sujets sans stimulation antigénique délibérée. Ces iso-hémagglutinines sont des anticorps de classe IgM dirigés contre les antigènes polysaccharidiques des groupes sanguins A et/ou B. L’absence d’hémagglutinines naturelles est observée au cours des déficits immunitaires du compartiment lymphocytaire B et des déficits immunitaires combinés sévères.

Détection des auto-anticorps [2]

Auto-anticorps non spécifiques d’organe

Les maladies auto-immunes non spécifiques d’organe sont associées à la présence d’auto-anticorps dirigés principalement contre les antigènes nucléaires que l’on met en évidence par une technique d’IFI utilisant comme substrat habituel les cellules HEP-2. Ces auto-anticorps donnent une fluorescence du noyau différente selon leur spécificité (voir Figure 1-5). L’aspect de l’IFI permet donc une première indication de la spécificité des anticorps détectés (Tableau 1-IV). L’identification molé-

Tableau 1-IV Spécificité des auto-anticorps en fonction de leur aspect en immunofluorescence indirecte sur cellules HEP-2.

Aspect de la fluorescence	Spécificité
Périphérique	Nucléosome, ADN
Homogène	Chromatine, subnucléosome, histones, ADN, topoisomérase II
Nucléolaire	Nucléoline, nucléosphosmine Fibrillarine, ARN polymérase NOR 90, PM/ScI
Moucheté	Sm, RNP, SS-A (Ro), SS-B (La), PCNA
Membrane nucléaire	Lamines A, C, B LAP1 et LAP2 gp120
Centromère	CEN-P-A, CEN-P-B, CEN-P-C
Appareil fusorial	NUMA MSA2 et MSA3
Cytoplasmique	Jo1, ribosome, mitochondrie Actine, vimentine

LAP: lamine-associated protein; MSA: microtubule associated protein; NUMA: nuclear mitotic apparatus; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; RNP: ribonucléoprotéine.

Tableau 1-V Auto-anticorps spécifiques d’une maladie auto-immune non spécifique d’organe.

Auto-anticorps	Maladies
Anti-ADN natif (à titre élevé)	Lupus
Anti-Sm	Lupus
Anti-Ma	Lupus
Anti-PCNA	Lupus
Anti-Scl70	Sclérodermie
Anti-centromère	Syndrome CREST
Anti-Jo1	Myosite

culaire des antigènes cibles des auto-anticorps donnant un profil particulier en IFI a permis leur purification, la mise au point de tests diagnostiques de type ELISA et la détection individuelle d’auto-anticorps spécifiques. Certains de ces auto-anticorps sont des marqueurs spécifiques des maladies auto-immunes (Tableau 1-V), d’autres des marqueurs d’évolutivité. C’est le cas des anticorps anti-ADN natif dont le taux peut être mesuré par une technique ELISA ou par la technique radio-immunologique de Farr et est corrélé à l’index d’activité clinique au cours du LES. Certains auto-anticorps constituent des marqueurs de sous-groupes d’une maladie auto-immune non spécifique d’organe. C’est le cas des anticorps anti-SS-A (Ro) qui peuvent s’observer au cours du lupus ou du syndrome de Gougerot-Sjögren et qui constituent un marqueur de risque de survenue de lupus néonatal. De même, les anticorps anti-Jo1 contribuent non seulement au diagnostic de polymyosite, mais sont aussi un marqueur d’atteinte pulmonaire interstitielle.

Il n’est pas rare que la présence d’anticorps antinucléaires dépistés par une réaction d’IFI ne soit pas associée à la présence d’auto-anticorps de spécificité connue. Dans ce cas, l’analyse du sérum en immunoeempreinte sur un extrait cellulaire ou nucléaire permet d’identifier la masse moléculaire de la protéine cible. L’identification de l’antigène peut alors faire appel aux techniques mentionnées ci-dessus, c’est-à-dire à l’immunocriblage d’une banque d’expression d’ADNc ou d’une carte protéomique de l’extrait cellulaire, suivi d’une analyse en spectrométrie de masse de la tache protéique reconnue par les auto-anticorps.

Anticorps antiphospholipides

Les anticorps antiphospholipides sont principalement représentés par les anticorps anticardiolipine qui sont détectés par une technique ELISA. Ces anticorps peuvent être de classe IgG et/ou IgM. Ils sont fréquemment associés à la présence d’anticorps de classes G et/ou M dirigés contre un cofacteur protéique permettant la reconnaissance des phospholipides par les anticorps antiphospholipides, la β_2 -glycoprotéine I. Il existe d’autres catégories d’auto-anticorps antiphospholipides, notamment les anticorps dirigés contre les phospholipides cationiques comme la phosphadidyl-éthanolamine dont la signification est discutée, comme il existe d’autres cofacteurs protéiques cibles des anticorps (Tableau 1-VI). Le syndrome des antiphospholipides peut également se manifester biologiquement par la présence d’un anticoagulant circulant. Une fausse sérologie syphilitique (positivité du VDRL) peut s’observer, de même que des anticorps antimitocondrie de type 5. C’est donc l’ensemble de ces éléments biologiques qu’il convient de rechercher pour réunir les éléments d’un syndrome des antiphospholipides.

Auto-anticorps dirigés contre les antigènes des éléments figurés du sang

L’auto-immunisation dirigée contre les globules rouges est mise en évidence par le test de Coombs direct qui permet la détection des antigènes et du complément fixés in vivo aux érythrocytes par l’ajout d’un

Tableau 1-VI Anticorps antiphospholipides et anticofacteurs des antiphospholipides.

Anticorps antiphospholipides
Anticardiolipine
Antiphosphatidyl sérine
Antiphosphatidyl éthanolamine
Anticorps anticofacteurs
Anti- β_2 -glycoprotéine I
Antiprothrombine
Antiprotéine C-protéine S
Anti-annexine V

sérum anti-IgG ou anticomplément et par l’analyse du sérum du malade qui permet notamment la détection des anticorps froids. On classe en effet les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) selon l’activité thermique des auto-anticorps : les anticorps froids se liant de façon optimale aux érythrocytes à 4 °C, les anticorps chauds à 37 °C. La majorité (70 p. 100) des malades présentant une AHAi ont des anticorps chauds, 15 à 20 p. 100 des anticorps froids et 10 p. 100 environ présentent les deux types d’anticorps. Les anticorps chauds sont principalement de classe G et dirigés, dans 50 p. 100 des cas, contre des antigènes du système Rhésus. Les anticorps froids sont le plus souvent de classe M et peuvent induire une agglutination des globules rouges. Ces agglutinines peuvent être polyclonales et reconnaissent alors l’antigène I ; elles peuvent être monoclonales et reconnaissent alors l’antigène I ou l’antigène i (syndrome lymphoprolifératif, maladie des agglutinines froides). La sévérité de l’hémolyse provoquée par les agglutinines froides dépend de leur amplitude thermique, c’est-à-dire de l’affinité des anticorps pour l’antigène érythrocytaire en fonction de la température.

L’immunisation antiplaquettaire est principalement dirigée contre les glycoprotéines IIIa, IIIb et Ib. Elle est détectée soit par le test de Coombs plaquettaire (dont le principe est identique au test de Coombs érythrocytaire), soit par le test MAPAI qui consiste à quantifier les molécules d’Ig à la surface des plaquettes.

L’auto-immunisation peut également intéresser les polynucléaires et être à l’origine d’une neutropénie auto-immune. Les auto-anticorps sont de classe G et principalement dirigés contre des récepteurs de surface, CD11b/CD18, CR1, Fc γ RII, plus rarement les antigènes NA1 et NA2 des granulocytes. Le diagnostic repose sur des tests indirects mesurant la liaison des anticorps d’un sérum à des granulocytes de donneur normal.

Auto-anticorps spécifiques d’organe

Dans la très grande majorité des cas, la stratégie de recherche d’auto-anticorps permettant de diagnostiquer une maladie auto-immune spécifique d’organe consiste successivement en la mise en évidence des anticorps dirigés contre le tissu par analyse en IFI, l’analyse du sérum en Western-blot et la détection d’anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes cibles, une fois ceux-ci identifiés. Un exemple en est donné par les maladies auto-immunes cutanées bulleuses telles que les pemphigus (Figure 1-12). Cette stratégie s’applique à de nombreuses autres maladies auto-immunes spécifiques d’organe (Tableau 1-VII), encore que la recherche directe d’auto-anticorps dirigés contre un antigène identifié par une technique ELISA soit fréquemment adoptée, notamment dans les maladies thyroïdiennes.

Détection des complexes immuns

Les complexes immuns sont formés de molécules d’Ig et des antigènes dont elles sont spécifiques. Leur formation est physiologique et induit

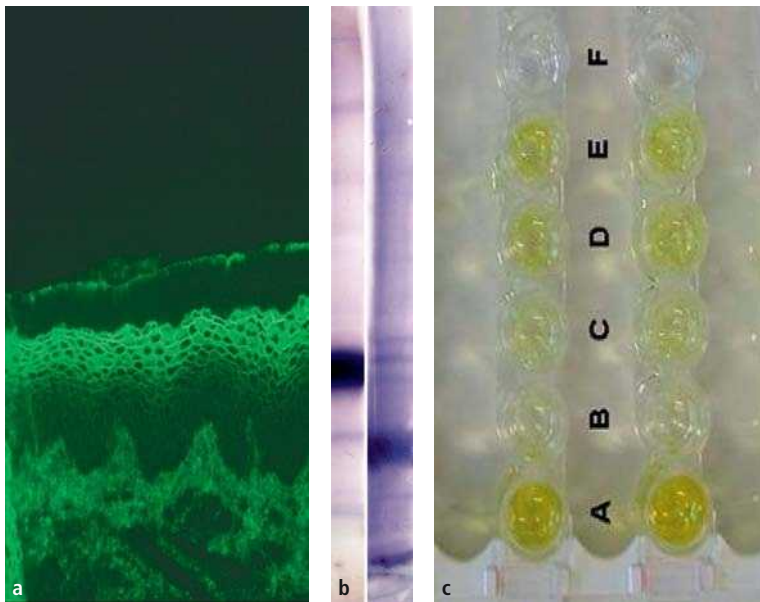


Figure 1-12 Analyse de la spécificité des anticorps anti-épiderme observés dans le sérum de malades atteints de pemphigus vulgaire ou de pemphigus superficiel. a) L'analyse en immunofluorescence indirecte du sérum montre une fluorescence en résille de l'épiderme témoignant de la présence d'anticorps antistabstance intercellulaire. b) L'analyse en immuno-empreinte d'un extrait d'épiderme avec le sérum de ces malades montre une réactivité dirigée contre une bande polypeptidique, soit de 130 kDa et correspondant à la desmogléine 3 (pemphigus vulgaire), soit de 160 kDa et correspondant à la desmogléine 1 (pemphigus superficiel). c) La desmogléine 3 ou la desmogléine 1, obtenues sous forme recombinante, sont fixées à un support solide et un test ELISA est effectué selon le principe illustré dans la figure 1-8. (Documents dus à Danièle Gilbert.)

Tableau 1-VII Techniques utilisées pour détecter et identifier les populations d'auto-anticorps au cours de maladies auto-immunes spécifiques d'organe.

Tissu	Maladie	Détection globale par IFI	IE (kDa)	Tests fonctionnels	Antigènes cibles	Tests utilisant l'antigène purifié
Peau	Pemphigus vulgaire	+	130	–	Desmogléine 3	ELISA
	Pemphigus superficiel	+	160	–	Desmogléine 1	ELISA
	Pemphigoïde bulleuse	+	180 et 210	–	BPAG1 et BPAG2	ELISA
	Dermatite herpétiforme					
Thyroïde	Thyroïdite de Hashimoto	–	–	TSII	TPO, Tg	
	Myxoedème	–	–	TSI	TPO, Tg, TSH-R	
	Maladie de Basedow	–	–			
Pancréas	Diabète de type 1	+	+		Insuline GAD65, IA-2	RIA ELISA IE
Rein	Syndrome de Goodpasture	+	+	–	Collagène de type IV	ELISA
	Syndrome hémolytique et urémique	–			Facteur H	Complément
	Purpura thrombotique	–			ADAMST13	ELISA
SNC	Syndromes paranéoplasiques	+		–	Hu, Yo, Ri	Dot, ELISA
	Encéphalite				Récepteur glutamate	
SNP	Neuropathies	–	–	–	MAG	ELISA
	– NMMBC	–	–	–	Gangliosides monosialylés	Dot, ELISA
	– neuropathies motrices	–	–	–		
Estomac	Gastrite	+	–	–	ATPase H ⁺ /K ⁺	ELISA

BPAG : antigène de la pemphigoïde bulleuse ; GAD65 : décarboxylase de l'acide glutamique ; IE : immuno-empreinte ; IFI : immunofluorescence indirecte ; MAG : glycoprotéine associée à la myéline ; NMMBC : neuropathies motrices multifocales avec bloc de conduction ; Tg : thyroglobuline ; TPO : thyroperoxydase ; TSH-R : récepteur de la TSH ; TSI : thyroid stimulating Ig ; TSII : thyroid stimulating inhibiting Ig.

l'activation de la voie classique du complément qui est essentielle à leur solubilisation et à leur clairance. En effet, l'activation de la voie classique s'accompagne de la libération de C4b et de C3b, qui se fixent à la surface des complexes immuns, induisent leur solubilisation et empêchent ainsi

leur dépôt tissulaire. Les complexes immuns solubilisés sont transportés aux cellules phagocytaires de la rate et du foie par les globules rouges. La détection des complexes immuns repose sur des techniques faisant appel soit à leurs propriétés physiques (masse moléculaire et pré-

cipitation au polyéthylène glycol) ou de cryoprécipitation (recherche de cryoglobuline), soit à leurs propriétés immunologiques, notamment la présence de complément au sein des complexes, comme la fixation du C1q, la déviation du C1q, la fixation aux cellules Raji. Ces dernières techniques sont aujourd'hui abandonnées.

Analyse des lymphocytes B

Analyse phénotypique des lymphocytes B

Les caractéristiques phénotypiques des lymphocytes B sont analysées par cytométrie de flux (*voir* « La cytométrie en flux et ses applications »). Cette analyse permet avant tout de dénombrer le nombre de lymphocytes B circulants grâce aux marqueurs CD19 et CD20 exprimés par la totalité des lymphocytes B matures ou à l'expression des Ig de surface en sachant que les cellules B matures portent des IgM et des IgD ou, après commutation isotypique, des IgG ou des IgA (Tableau 1-VIII). L'étude phénotypique permet aussi de distinguer, d'une part, les lymphocytes B naïfs des lymphocytes B mémoires grâce à la molécule CD27 et, d'autre part, les sous-populations lymphocytaires B : lymphocytes B transitionnels, récemment émigrés de la moelle osseuse, lymphocytes matures naïfs, lymphocytes B de la zone marginale, support cellulaire de la réponse vis à vis des antigènes thymo-indépendants. La caractérisation de ces sous-populations lymphocytaires (*voir* Tableau 1-VIII) a un intérêt au cours des déficits immunitaires communs variables (détermination de la présence de cellules mémoires), des maladies auto-immunes comme le syndrome de Gougerot-Sjögren et des syndromes lymphoprolifératifs (présence de lymphocytes B CD5⁺).

Exploration des propriétés fonctionnelles des lymphocytes B

Les propriétés fonctionnelles sont évaluées par l'étude de la prolifération des lymphocytes B ou de leur différenciation en cellules sécrétrices d'immunoglobulines.

La prolifération des cellules B peut être analysée *in vitro* après leur activation par le pontage des immunoglobulines de surface (soit par des anticorps anti-IgM, soit par la protéine A du staphylocoque Cowan) et par un deuxième signal. Celui-ci peut être apporté par des interleukines (IL-2, IL-4 ou IL-10) ou l'activation du CD40 par un anticorps monoclonal agoniste ou le ligand du CD40 exprimé par une cellule transfectée. La prolifération des cellules B est évaluée après 72 heures de culture par la mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des cellules en division. L'étude de la sécrétion d'immunoglobulines se fait dans les mêmes conditions de stimulation, après une culture cellulaire poursuivie 5 à 7 jours. Les cellules B se différencient en effet en plasmocytes *in vitro* et produisent des molécules d'immunoglobulines détectables dans le milieu de culture par une technique ELISA. La mesure de la quantité d'immunoglobuline sécrétée permet d'évaluer la capacité de différenciation des cellules B *in vitro*. Il est aussi possible de déterminer le nombre de cellules B pro-

Tableau 1-VIII Principaux marqueurs utilisés pour l'immunophénotypage des lymphocytes B.

Marqueurs pan-B

CD19, CD20, immunoglobulines de surface

Principales sous-populations définissables phénotypiquement dans le sang

IgM ⁺ , IgD ⁺ , CD27 ⁻	B matures naïfs
IgM ⁺ , IgD ⁺ , CD27 ⁺	B de la zone marginale
IgM ⁻ , IgD ⁻ , CD27 ⁺	B mémoires commutés
CD19 ⁺ , CD21 ⁻ , CD26 ⁺ , CD38 ⁺	B transitionnels

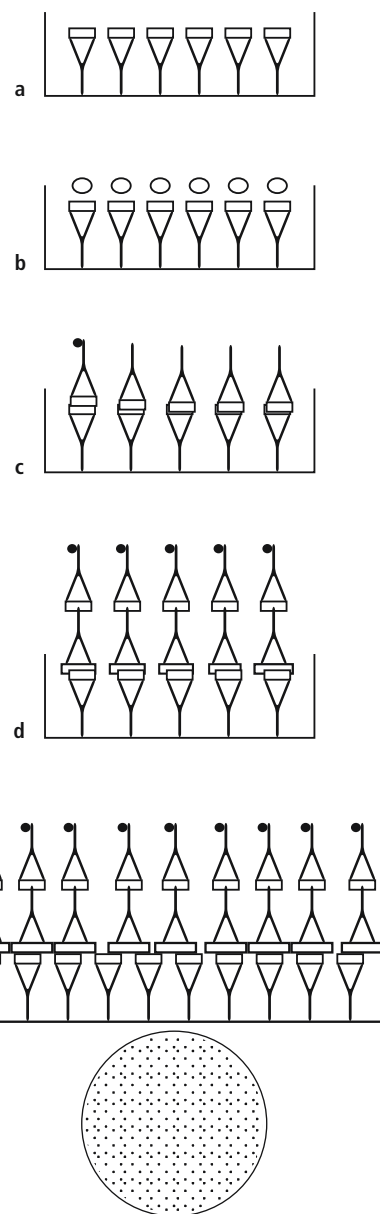


Figure 1-13 Évaluation du pourcentage de lymphocytes B circulants sécréteurs de molécules d'immunoglobulines. a) La plaque de culture est recouverte d'anticorps anti-immunoglobulines humaines. b) Les lymphocytes B sont incubés, stimulés, et les immunoglobulines sécrétées sont capturées. c) Après lyse des cellules et lavage, les anticorps anti-immunoglobulines humaines biotinylées sont ajoutés. d) Le complexe avidine-enzyme est incubé. e) Le substrat de l'enzyme est ajouté et les « spots » sont comptés.

duisant des immunoglobulines. La technique utilisée est l'ELISPOT (Figure 1-13) qui peut aussi évaluer le nombre de cellules B sécrétrices de molécules d'immunoglobulines spécifiques d'un antigène donné.

Exploration du système complémentaire [4]

Le système complémentaire participe aux mécanismes de défense vis-à-vis des infections bactériennes et virales par son rôle dans la stimulation de la phagocytose des bactéries par les cellules du système monocytaire macrophagique (opsonisation), la lyse d'agents bactériens

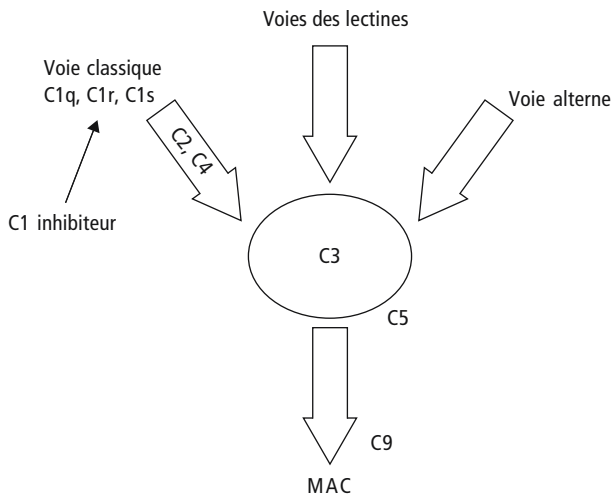


Figure 1-14 Voies d'activation du complément. Le schéma montre les trois voies d'activation du système complémentaire, le rôle de la molécule C3 et la voie lytique C5-C9.

ou viraux, la libération de facteurs chimiotactiques et anaphylactiques (respectivement C5a et C3a) et la solubilisation des complexes immuns. Il participe aussi à l'activation du système immunitaire adaptatif par l'initiation de la réponse lymphocytaire B, notamment par l'interaction de la molécule C3d avec le CR2 exprimé par les lymphocytes B. Les propriétés fonctionnelles du système complémentaire s'exercent en outre grâce à la présence à la surface cellulaire, de récepteurs pour certains fragments du complément. La figure 1-14 montre les trois voies d'activation du complément, la place centrale de la molécule C3 et la voie lytique terminale. L'activation du système complémentaire est contrôlée par des protéines du sérum ou exprimée à la surface des cellules.

L'exploration du système complémentaire vise à mettre en évidence trois grands types d'anomalies : la consommation de composants par la mise en jeu des voies d'activation, les déficits en complément et la production d'auto-anticorps dirigés contre des composants. Son exploration initiale repose sur la détermination du CH50, le dosage du C4, du facteur B et du C3 [4].

L'activation des protéines du complément joue, de plus, un rôle majeur dans la réponse inflammatoire et le déclenchement des lésions tissulaires au cours de nombreuses maladies systémiques. Les profils observés permettent donc une orientation diagnostique (Tableau 1-IX). Les déficits en complément sont à l'origine de maladies inflammatoires ou d'une susceptibilité aux infections. Ainsi les déficits des composants de la voie classique exposent-ils à la survenue d'un LES, qu'ils s'agissent des exceptionnels déficits en C1q ou en C1r/C1s, de déficits en C4 dont les déficits complets sont rares ou du déficit homozygote en C2. Leur diagnostic repose sur la détermination du CH50 et le dosage des composants C3, C4 et C1q. Les déficits portant sur la voie lytique terminale s'accompagnent principalement de manifestations infectieuses à *Neisseria*. L'exploration comporte ici encore la détermination du CH50 et la correction de celui-ci par l'ajout du facteur purifié manquant. L'œdème angioneurotique est lié à un déficit quantitatif ou fonctionnel du C1 inhibiteur, déficit qui peut être héréditaire ou acquis. Le déficit héréditaire en C1 inhibiteur est caractérisé par une diminution du CH50, la consommation de C4 et un taux normal de C1q. Le C1 inhibiteur peut être soit diminué, soit non fonctionnel. Le déficit acquis en C1 inhibiteur est dépistée sur la diminution du CH50, du C4 et du C1q. Il peut être lié à la présence d'anticorps anti-C1 inhibiteur. Des anomalies du

Tableau 1-IX Profils d'activation du complément observés au cours de différentes situations pathologiques.

Voie d'activation	CH50	C4	C3	B	Pathologies
Classique	↓	↓	↓	N	Lupus, vascularite systémique, cryoglobulinémie essentielle, maladies du sérum
Alterne	↓	N	↓	↓	Glomérulonéphrite aiguë post-streptococcique, C3Nef, bactériémie à Gram négatif, déficit en facteur H ou facteur I
Classique et alterne	↓	↓	↓	↓	Lupus, glomérulonéphrite membranoproliférative de type I
Activation phase fluide	↓	↓	N	N	Œdème angioneurotique
Erreur de prélèvement	↓	N	N	N	Prélèvement conservé trop longtemps à température ambiante

complément peuvent en effet être liées à la production d'auto-anticorps dirigés contre les fractions du complément. À côté de l'œdème angioneurotique acquis et associé à des anticorps anti-C1 inhibiteur, il faut mentionner la production d'anticorps anti-C1q au cours du LES qui serait positivement corrélée à la présence d'une atteinte rénale, à la présence d'anticorps anti-C3 convertase soit de la voie classique, soit de la voie alterne qui s'accompagne d'une glomérulonéphrite membranoproliférative ou enfin d'anticorps antifacteur H que l'on peut observer au cours de certains syndromes hémolytiques et urémiques.

Analyse des lymphocytes B au niveau de l'ARN [8]

Il est possible d'analyser l'expression d'un gène au sein des lymphocytes B par la détection et la quantification des ARN messagers (ARNm). On peut ainsi détecter la présence des ARNm par la technique du Northern-blot, du dot-blot et de la RT-PCR. Ces techniques ont cependant leurs propres limites car elles ne permettent pas l'analyse simultanée et globale des gènes impliqués dans les anomalies des lymphocytes B au cours des maladies auto-immunes et des syndromes lymphoprolifératifs. La technique des *micro-arrays* permet l'étude de l'abondance des transcrits à grande échelle, c'est-à-dire l'analyse des transcriptomes. Celle-ci permet l'évaluation de l'expression de milliers de gènes simultanément et d'obtenir ainsi des signatures moléculaires d'un état d'activité de la cellule, donc une vision globale du fonctionnement cellulaire lors d'une situation physiologique ou pathologique à un instant donné. La technologie des puces ou *arrays* repose sur l'hybridation d'un jeu ordonné de sondes d'ADN ou de courts oligonucléotides fixés sur un support solide avec des cibles préparées à partir des ARNm extraits des lymphocytes B. La figure 1-15 résume les différentes étapes de la technique des *macro-arrays*. La technologie des *micro-arrays* utilise un support en verre et la fluorescence pour le marquage des cibles.

Les applications cliniques principales sont :

- l'identification du profil d'expression ou de la signature moléculaire caractéristique d'une maladie, donnant une vision globale du niveau d'expression des gènes, et donc l'identification de marqueurs diagnostiques ou pronostiques de la maladie ;
- une approche physiopathologique par le regroupement des gènes ayant un profil d'expression similaire ;

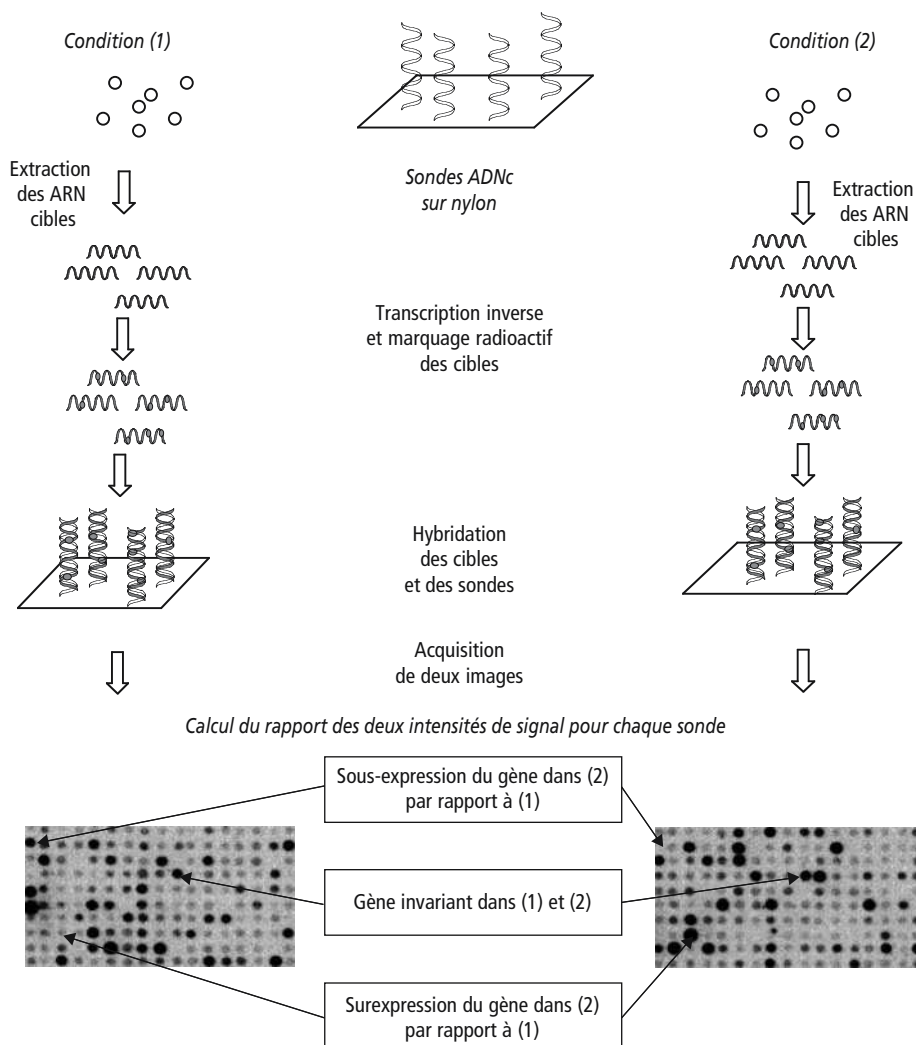


Figure 1-15 Analyse du transcriptome des lymphocytes B par la technique des *macro-arrays*. Les cibles extraites des lymphocytes B et marquées par radioactivité sont hybridées avec un jeu ordonné de sondes immobilisées sur une membrane de nylon. Le rapport des deux intensités de signal propres à chaque ARNm dans chacune des deux conditions traduit le niveau de fluctuation d'expression des gènes. Plusieurs méthodes bio-informatiques ont été développées pour analyser les larges quantités de données générées par ces expériences de *macro-arrays*. On peut ainsi comparer l'expression différentielle des gènes entre les deux échantillons.

– l'identification de marqueurs prédictifs de réponse à un traitement.

La puissance de l'analyse des transcriptomes laisse augurer de nouvelles classifications diagnostiques ou pronostiques dans les maladies touchant le lymphocyte B [8].

Analyse des lymphocytes B au niveau de l'ADN

Cette analyse a essentiellement pour but de rechercher, au sein d'une population cellulaire, un réarrangement prédominant des segments génétiques codant une chaîne lourde d'Ig, ce qui permet de détecter une prolifération monoclonale B. L'approche aujourd'hui utilisée est l'analyse de la taille de la jonction V-D-J (Figure 1-16). Celle-ci est hétérogène au sein d'une population lymphocytaire polyclonale. L'analyse des produits d'amplification de ces fonctions donne donc un aspect diffus dans un gel d'agarose. La présence d'un

clone B prépondérant se traduit par un produit d'amplification de taille unique et qui constitue une véritable « bande étroite » d'ADNc (voir Figure 1-16).

Exploration du compartiment lymphocytaire T

Diversité des populations lymphocytaires T

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes exprimés à la surface d'une autre cellule. Ils possèdent pour cette fonction un récepteur clonal, le récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (TCR pour *T cell receptor*), associé au multimère CD3. L'essentiel des lymphocytes T possèdent un TCR de type $\alpha\beta$ qui reconnaît les antigènes sous la forme de peptides présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompa-

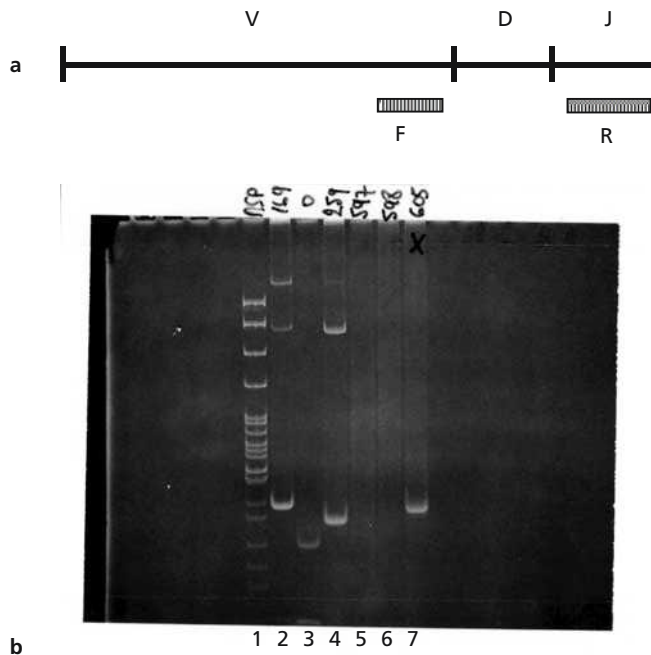


Figure 1-16 Analyse dans un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des jonctions V(D)J des chaînes lourdes d'immunoglobulines. a) L'ADN est extrait des lymphocytes et les jonctions (V, D, J) sont amplifiées par PCR à l'aide des amorces (R et F) encadrant cette séquence. b) Dans le gel d'agarose, la piste de gauche correspond aux marqueurs de taille ; les pistes 2, 4 et 7 à l'amplification de l'ADN d'une population lymphocytaire contenant un clone lymphocytaire B, les pistes 3, 5 et 6 à l'amplification de l'ADN d'une population lymphocytaire B polyclonale.

tibilité HLA ; et ils expriment de façon mutuellement exclusive un corécepteur CD4 ou CD8 en fonction de la classe de molécule HLA qui restreint leur reconnaissance antigénique, classe II (HLA-DR, DQ, DP) ou classe I (HLA-A, B, C), respectivement. Un lymphocyte T donné n'exprime qu'une seule chaîne TCR- β , associée à une (ou deux) chaîne(s) TCR- α .

Les lymphocytes T CD3⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺ se différencient dans le thymus à partir d'un précurseur lymphoïde issu de la cellule souche hématopoïétique, puis quittent cet organe sous forme de lymphocytes naïfs qui circulent dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires (et non dans les tissus périphériques). La réponse immunitaire T adaptative est initiée dans les organes lymphoïdes secondaires par la reconnaissance d'antigènes présentés sous forme de complexe HLA/peptides par des cellules dendritiques activées qui y migrent à partir des tissus périphériques. Les lymphocytes ainsi activés vont alors subir une expansion clonale et se différencier en cellules effectrices dont une partie persistera sous forme de lymphocyte mémoire. Parmi les sous-populations fonctionnelles des lymphocytes T CD3⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺, effectrices ou régulatrices, citons les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires T_H1 sécréteurs de cytokines de type 1 (interleukine 2, interféron γ), les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires T_H2 sécréteurs de cytokines de type 2 (interleukine 4, interleukine 10), les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires T_H17 sécréteurs d'IL-17 et d'IL-22, les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires folliculaires T_{FH}, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, les lymphocytes T régulateurs naturels ou induits (T reg) CD4⁺ CD25⁺ qui régulent physiologiquement l'immunité et T_R1 (sécréteurs d'interleukine 10) qui apparaissent dans certaines conditions d'activation [5].

Outre les lymphocytes conventionnels CD3⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺, il existe d'autres populations, minoritaires dans le sang, mais qui peuvent être retrouvées en plus grande abondance dans certains tissus ou organes : les lymphocytes T CD3⁺ TCR- $\gamma\delta$ ⁺ qui reconnaissent des phospho-antigènes, les lymphocytes NKT CD3⁺ TCR- $\alpha\beta$ ⁺ exprimant des marqueurs de cellules NK qui reconnaissent des lipides antigéniques présentés par les molécules CD1d. Enfin les cellules NK CD3⁻ dépourvues de TCR qui lysent naturellement les cellules ayant perdu l'expression de certaines molécules HLA de classe I (cellules infectées, cellules tumorales) appartiennent aux lymphocytes de l'immunité naturelle avec d'autres populations sécrétrices de cytokines.

Ordres de grandeur de la taille et de la diversité des compartiments T

Pour interpréter les résultats d'une exploration des lymphocytes T, il convient de prendre en considération certains ordres de grandeur. Rappelons d'abord que, de façon comparable à la lymphopoïèse B, le réarrangement de l'ADN germlinal au niveau des loci codant les chaînes TCR- α et TCR- β donne naissance à un large répertoire (ensemble des spécificités clonales portées par les TCR des lymphocytes T) qui permet la reconnaissance d'un nombre virtuellement illimité d'antigènes. Parmi les nombreux segments génétiques disponibles au locus TCR-B (et TCR-A), le réarrangement va juxtaposer un segment unique TCR-V β , D β et J β (et TCR-V α et J α pour la chaîne α), pour aboutir in fine à un gène complet VDJ β -C β et VJ α -C α codant respectivement une chaîne TCR- β et une chaîne TCR- α complète. Des mécanismes moléculaires additionnels vont entraîner une variabilité génétique considérable, principalement à la jonction V(D)J qui correspond à la région CDR3 de la molécule qui entre en contact avec le peptide antigénique sur la molécule HLA. La diversité issue de ce mécanisme peut être estimée à environ 25×10^6 TCR- $\alpha\beta$ différents dans le sang à l'âge adulte. On évalue par ailleurs à $5-10 \times 10^{11}$ le nombre total de lymphocytes T dans l'organisme. Le nombre de lymphocytes T sanguins totaux s'établit quant à lui à environ 10^{10} cellules (ce que l'on peut retrouver aisément en calculant : lymphocytose $1-4 \times 10^9/l \times$ volémie $5l \times$ fréquence des lymphocytes T 70-80 p. 100). Ainsi, s'il est usuel de considérer que les lymphocytes T sanguins sont globalement représentatifs de l'ensemble des lymphocytes T de l'organisme, il convient de rappeler qu'ils ne représentent en fait que $10^{10}/5-10 \times 10^{11} = 1-2$ p. 100 de ce compartiment (le reste étant principalement localisé dans les organes lymphoïdes secondaires, rate et ganglions lymphatiques, avec un compartiment abondant dans les structures lymphoïdes associées au tube digestif) et que d'importantes variations de répartition de sous-populations ainsi que d'états fonctionnels existent en fonction des localisations lymphoïdes ou extralymphoïdes. Par exemple, les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont rares dans le sang mais retrouvés en fréquence plus élevée au sein des lymphocytes intra-épithéliaux de l'intestin.

En termes clonaux, la comparaison de la diversité du répertoire T sanguin (25×10^6 TCR- $\alpha\beta$ différents) et de la taille de ce compartiment (10^{10} cellules) indique que la taille d'un clone donné est environ de 10^2 à 10^3 cellules. Cet ordre de grandeur, purement théorique, est en fait inégalement réparti entre deux populations : les lymphocytes T naïfs (avant la rencontre avec l'antigène) dont le répertoire est très diversifié et la taille des clones plus restreinte, et les lymphocytes T mémoires dont le répertoire est plus restreint (il a été sélectionné en réponse à un nombre limité d'antigènes) et la taille des clones plus grande (du fait de l'expansion clonale). Proche de 100 p. 100 à la naissance, le rapport lymphocytes T naïfs/lymphocytes T totaux diminue en fonction de l'âge, traduisant l'accumulation des rencontres antigéniques au cours de la vie. Terminons ces considérations numériques sur le

système immunitaire à l'homéostasie en rappelant que des variations d'une ampleur extrême peuvent survenir en quelques jours lors d'une infection virale aiguë, par exemple. Ainsi, longtemps sous-estimée, l'expansion clonale par division cellulaire des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques répondant à un virus donné augmente de façon explosive leur représentation au sein du répertoire, avec une fréquence qui peut passer de $1/10^{-5}$ - 10^{-4} à 1/2 lymphocyte spécifique/lymphocytes totaux. À l'issue de la phase infectieuse aiguë, cette expansion est suivie d'une contraction très importante de la taille des clones dont il restera cependant une surreprésentation au sein du compartiment mémoire, favorisant ainsi l'efficacité d'une éventuelle réponse secondaire.

Conséquences de la diversité du répertoire sur la tolérance immunitaire

Les mécanismes moléculaires de génération du répertoire permettent donc de produire, à partir d'un nombre limité de segments géniques, un nombre très élevé de TCR différents, mais le caractère aléatoire de ce processus nécessite des processus de sélection au sein du thymus afin d'établir un répertoire fonctionnel et régulé. En effet, l'essentiel des réarrangements aboutit à la production de TCR incapables d'interagir avec les molécules HLA d'un individu donné et qui ne sont pas conservés dans le répertoire définitif (90 p. 100 des thymocytes sont ainsi détruits in situ). La sélection positive va aboutir à un répertoire T biaisé pour la reconnaissance des molécules HLA, ce qui permet la survie des lymphocytes T naïfs en périphérie (qui nécessite des interactions répétées TCR/HLA) et la réponse immunitaire T adaptative (qui nécessite la reconnaissance de peptides présentés par ces mêmes molécules HLA). Une conséquence de ce processus de sélection positive est donc que, contrairement à une idée encore largement répandue, le répertoire T présente physiologiquement un certain degré d'autoréactivité puisque les TCR des lymphocytes T ont été sélectionnés pour reconnaître les molécules HLA autologues présentant des peptides également issus de protéines autologues. Deux mécanismes de tolérance sont donc mis en œuvre au niveau du thymus afin d'éviter que cette autoréactivité physiologique n'aboutisse à une auto-immunité pathologique : la sélection négative (qui entraîne la destruction de certains clones T dont les TCR reconnaissent avec une forte affinité des complexes HLA/peptides présents dans le thymus) et la production de lymphocytes T régulateurs naturels CD4⁺ CD25⁺. En effet, la sélection négative n'est que partielle puisqu'elle ne peut intervenir que pour éliminer des thymocytes reconnaissant des auto-antigènes présents dans le thymus au moment de leur différenciation, ce qui n'est évidemment pas le cas de tous les auto-antigènes. On trouve ainsi, de façon physiologique chez un individu sain, des lymphocytes T reconnaissant par exemple la protéine basique de la myéline, un auto-antigène reconnu au cours de la sclérose en plaques. Deux modes principaux de contrôle s'exercent en périphérie sur ces lymphocytes autoréactifs : d'une part, l'absence d'activation lors de la reconnaissance d'une cellule portant l'auto-antigène, en dehors d'une stimulation forte par une cellule dendritique mature activée exprimant des cosignaux d'activation dans les organes lymphoïdes secondaires et, d'autre part, l'inhibition par les lymphocytes T régulateurs naturels CD4⁺ CD25⁺ qui sont produits par le thymus mais exercent leur fonction suppressive en périphérie.

Principes généraux de l'exploration du compartiment lymphocytaire T

L'exploration du compartiment lymphocytaire T s'intéresse donc principalement à la détermination du nombre, à la distribution des

sous-populations et à la fonction des lymphocytes T. La cytométrie en flux est aujourd'hui la principale approche méthodologique utilisée dans ce but car elle permet l'immunophénotypage, c'est-à-dire l'étude simultanée de la distribution de plusieurs marqueurs caractéristiques du lignage (CD4, CD8, TCR- $\gamma\delta$, T NK, T régulateur), de l'état d'activation (au repos ou activé) ou de l'expérience antigénique (naïf ou mémoire) des lymphocytes T, voire de leur spécificité antigénique (méthode des tétramères), de leur répertoire (analyse de l'utilisation des segments V du TCR- β) ou de leur capacité à produire des cytokines (marquages intracellulaires). On gardera toutefois à l'esprit que, même s'il s'agit d'une démarche pragmatique utile en pratique, considérer une équivalence stricte entre un phénotype (par exemple, CD45RA⁺ ou CD4⁺ CD25⁺) et une fonction (cellule naïve ou cellule régulatrice, respectivement) constitue une approche simplificatrice puisque, dans notre expérience, certains lymphocytes T mémoires peuvent retourner à un phénotype CD45RA⁺ et que des lymphocytes T activés effecteurs et non régulateurs peuvent transitoirement acquérir un phénotype CD4⁺ CD25⁺.

La cytométrie en flux et ses applications

Principes

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse multiparamétrique de populations cellulaires en suspension. Elle est donc particulièrement adaptée à l'analyse des cellules du système immunitaire. Un cytomètre combine un circuit hydraulique, un circuit optique et un système informatique. Les cellules en suspension circulent dans le circuit hydraulique où elles sont séparées au sein d'une gaine liquide afin qu'elles se présentent une à une, par l'intermédiaire d'une buse de focalisation, à l'intersection du circuit optique. Le circuit optique est composé d'une source lumineuse intense, de filtres qui discriminent les différentes longueurs d'ondes des rayonnements émis par les cellules et de photomultiplicateurs qui transforment ces rayonnements en signaux électriques mesurables. La source lumineuse qui éclaire les cellules est le plus souvent un laser émettant une lumière monochromatique bleue d'une longueur d'onde de 488 nm, complété le cas échéant par des sources additionnelles émettant dans le rouge, voire l'ultraviolet. Le système informatique permet de transformer les données analogiques issues des photomultiplicateurs en données numériques, de représenter sous forme graphique la distribution des signaux lumineux, d'effectuer les calculs nécessaires à la détermination de l'intensité de ces signaux et de la fréquence des sous-populations cellulaires, et de stocker ces données le cas échéant. Une catégorie particulière de cytomètres, les trieurs de cellules, dispose en plus d'un système de séparation cellulaire qui permet de purifier des populations définies par des critères cytométriques de taille et de fluorescence. La vitesse de fonctionnement des cytomètres actuels permet couramment l'analyse de plusieurs milliers de cellules par seconde.

Taille des cellules et immunophénotypage

La cytométrie permet tout d'abord d'évaluer la taille et le contenu interne (ou granulométrie) des cellules par leur propriété de diffraction de la lumière incidente. Il ne s'agit donc pas ici de fluorescence

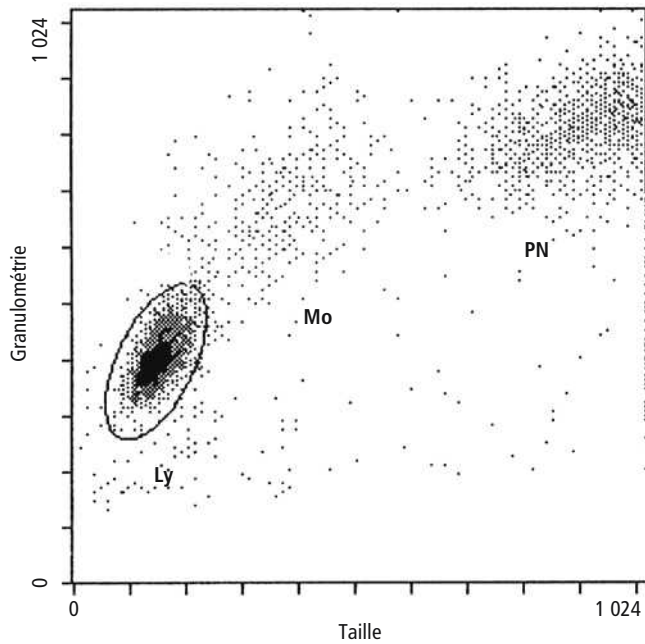


Figure 1-17 Analyse de la taille et de la granulométrie des cellules sanguines par cytométrie en flux. La cytométrie permet de déterminer la distribution des populations de lymphocytes (Ly), monocytes (Mo) et polynucléaires (PN) sur la base de leur taille et de leur granulométrie. Chaque point représente une cellule. Il est possible de définir une fenêtre d'analyse (ovale) qui permet de restreindre les analyses de fluorescence ultérieures à une sous-population donnée. Dans cet exemple, un échantillon sanguin a été soumis à une lyse préalable des globules rouges, puis l'analyse a permis de définir, au sein des leucocytes, la population des lymphocytes.

puisque'il n'y a pas de modification de la longueur d'onde. La taille est proportionnelle à l'intensité des signaux lumineux collectés sur un axe voisin de celui du faisceau incident : il s'agit de la diffraction aux petits angles (FSC pour *forward scatter*). La granulométrie est, quant à elle, proportionnelle à l'intensité des signaux lumineux collectés sur un axe latéral par rapport au faisceau incident : il s'agit de la diffraction aux grands angles (ou SSC pour *side scatter*). La représentation en histogramme biparamétrique (*dot plot*), où chaque cellule est représentée par un point, permet de distinguer aisément les lymphocytes (taille moyenne, faible granulométrie) des autres cellules sanguines comme les monocytes et les polynucléaires (plus grands et plus granuleux) (Figure 1-17).

La cytométrie permet également l'analyse simultanée des rayonnements de fluorescence émis par les cellules après excitation lumineuse. Dans le cas général, on utilise des combinaisons d'anticorps monoclonaux préalablement couplés à des fluorochromes. Les fluorochromes sont des substances chimiques (comme l'isothiocyanate de fluorescéine, la phyco-érythrine, les cyanines ou des combinaisons en tandem de certaines de ces molécules) qui ont la propriété d'émettre, après excitation, un rayonnement d'une longueur d'onde supérieure (donc d'énergie moindre) à celle du faisceau incident. Chaque fluorochrome est donc caractérisé par un spectre d'excitation et par un spectre d'émission qui permettent de l'identifier. L'un des intérêts majeurs de la cytométrie est de pouvoir déterminer la distribution de marqueurs cellulaires sur chaque cellule en étudiant la répartition des signaux lumineux que les cellules émettent individuellement lorsqu'elles ont été préalablement marquées par

des anticorps monoclonaux spécifiques fluorescents. On peut déterminer la fréquence des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sanguins, par exemple, en utilisant un marquage simultané par un anticorps anti-CD4 marqué par la fluorescéine (excitable à 488 nm, émission dans le vert-jaune) et un anticorps anti-CD8 marqué par la phyco-érythrine (également excitable à 488 nm, émission dans le rouge). Pour cela, on détermine tout d'abord une fenêtre informatique permettant de restreindre l'analyse aux seuls lymphocytes définis sur les paramètres de taille et de granulométrie. Au sein de cette fenêtre, le logiciel calcule la fréquence des cellules émettant dans le vert et non dans le rouge, les lymphocytes CD4⁺, et celle des cellules émettant dans le rouge et non dans le vert, les lymphocytes CD8⁺. Il est aujourd'hui usuel d'analyser simultanément quatre marqueurs fluorescents. Les cytomètres les plus récents, combinant deux, voire trois sources lumineuses, des jeux complexes de filtres et de nombreux détecteurs, permettent d'augmenter le nombre de marqueurs simultanés à huit ou plus. À l'heure actuelle, ces dernières applications relèvent plus de la recherche que de la routine de biologie clinique. Des exemples sont donnés dans les figures 1-18 et 1-19.

L'intensité des signaux émis par les cellules marquées est proportionnelle à la densité des molécules de surface reconnues par les anticorps fluorescents. Le plus souvent, il est aisé de distinguer les cellules négatives (par exemple, les cellules CD3⁻) des cellules positives (les lymphocytes T CD3⁺) qui apparaissent comme des populations nettement séparées sur les graphes de cytométrie. En revanche, des molécules comme certains marqueurs d'activation, par exemple, peuvent être distribuées de façon quasi continue au sein d'une population lymphocytaire donnée, et il convient de définir le seuil de fluorescence au-delà duquel le marquage est considéré

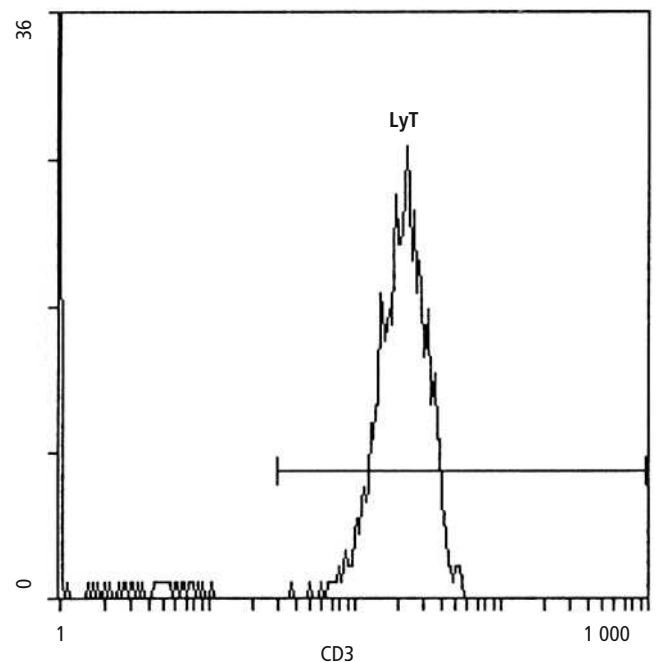


Figure 1-18 Exemple d'histogramme monoparamétrique : analyse des lymphocytes CD3⁺. Après marquage des cellules sanguines par un anticorps fluorescent dirigé contre la molécule CD3, on étudie la distribution de la fluorescence au sein des lymphocytes définis par leur taille et granulométrie (voir Figure 1-17). Dans cet exemple, plus de 80 p. 100 des lymphocytes sont CD3⁺, il s'agit donc des lymphocytes T.

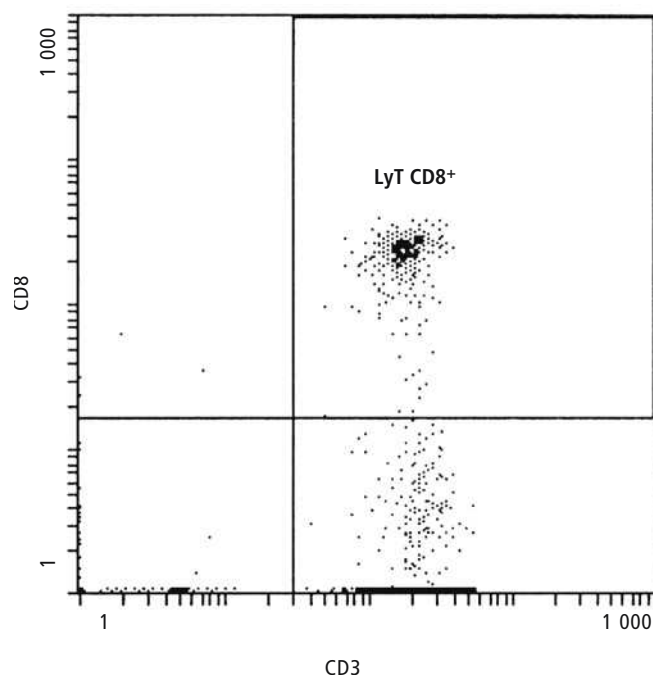


Figure 1-19 Exemple d'histogramme biparamétrique : analyse des lymphocytes T CD8⁺. Ici, on analyse la fluorescence après marquage simultané par deux anticorps monoclonaux différents, l'un dirigé contre CD3 (marquant tous les lymphocytes T) et l'autre marquant la sous-population CD8⁺. Les quadrants permettent de compter les cellules dans chaque sous-population. On remarque que tous les lymphocytes T CD8⁺ sont CD3⁺ mais que certains lymphocytes T CD3⁺ sont CD8⁻ : il s'agit des lymphocytes T CD4⁺.

comme positif. On utilise généralement pour cela des témoins négatifs qui sont des anticorps de même isotype et couplés au même fluorochrome, mais qui ne reconnaissent pas d'antigène à la surface de la population cellulaire étudiée et dont la fluorescence basale définit donc le niveau du bruit de fond. Il existe enfin des situations où, au sein des cellules positives, c'est le niveau d'expression d'un marqueur donné qui permet de distinguer des sous-populations. Ainsi, au sein des lymphocytes T CD4⁺, les cellules CD25⁺ se répartissent-elles en cellules exprimant un niveau intermédiaire CD25^{int} (il s'agit alors de lymphocytes activés) et en cellules CD25^{hi} très fortement positive (les lymphocytes T régulateurs naturels) (Figure 1-20).

Les données de cytométrie sont essentiellement des mesures de fréquence cellulaire. Les nombres absolus (lymphocytose CD4, par exemple) sont obtenus par multiplication des fréquences (en pourcentages) par la lymphocytose (en g/l), ce qui suppose d'effectuer toujours une numération-formule sanguine en parallèle d'un immunophénotypage. Une alternative consiste à quantifier directement les cellules en comparant leur nombre à celui de billes fluorescentes de concentration connue ajoutées à l'échantillon en amont de l'analyse.

L'immunophénotypage s'intéresse donc à la distribution des marqueurs de surface lymphocytaires. Les marqueurs dits pan-T sont ceux exprimés par la totalité des lymphocytes T : CD3, CD2, CD5, CD7. Ces marqueurs pan-T ne sont toutefois pas nécessairement des marqueurs T-spécifiques puisque CD2, par exemple, est également un marqueur des cellules NK. Le tableau 1-X donne des exemples de marqueurs courants utilisés pour l'immunophénotypage.

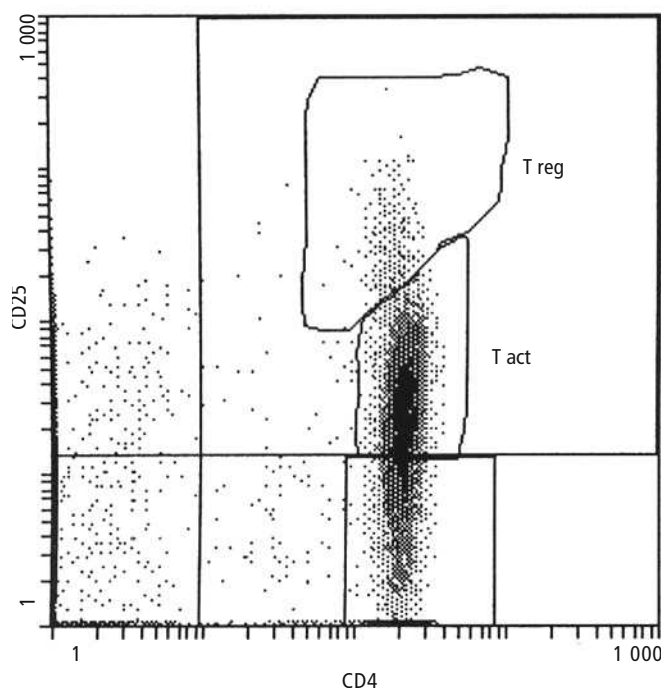


Figure 1-20 Analyse des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25^{hi}. Après marquage simultané par des anticorps monoclonaux fluorescents dirigés contre CD4 et CD25, on observe trois populations de lymphocytes CD4⁺ : CD25⁻, CD25^{int} et CD25^{hi}. Les cellules CD4⁺ CD25^{int} représentent des lymphocytes T activés (Tact) alors que les cellules CD4⁺ CD25^{high} sont des lymphocytes T régulateurs (Treg).

Tableau 1-X Principaux marqueurs utilisés pour l'immunophénotypage des lymphocytes T.

Marqueurs pan-T

CD2, CD3, CD5, CD7

Principales sous-populations T définissables phénotypiquement dans le sang

CD3⁺ CD4⁺ (lymphocytes T auxiliaires)
 CD3⁺ CD8⁺ (lymphocytes T cytotoxiques)
 CD3⁺ CD4⁺ CD25^{hi} (lymphocytes T régulateurs naturels)
 CD3⁺ TCR- $\gamma\delta$ ⁺ (lymphocytes T $\gamma\delta$)
 CD3⁻ CD16/56⁺ (cellules NK)
 CD3⁺ tétramère CD1d⁺ (lymphocytes NKT)

Marqueurs associés à une fonction

CD28 (co-stimulation)
 CD25, CD69, HLA-DR, CD71, CD154 (activation)
 CD62L⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ (lymphocyte T naïf)
 CD62L⁻ CD45RA⁻ CD45RO⁺ (lymphocyte T mémoire)

Détection de molécules intracellulaires

Outre la distribution des marqueurs de surface, la cytométrie peut également être utilisée pour détecter des molécules intracellulaires, ce qui nécessite alors une perméabilisation membranaire afin de permettre la pénétration de l'anticorps. Il est ainsi possible de détecter à l'intérieur des cellules des molécules de costimulation dépendantes de l'activation comme CD152 (CTLA4), voire des facteurs de transcription comme Foxp3 (caractéristique des lymphocytes T régulateurs) (Figure 1-21).

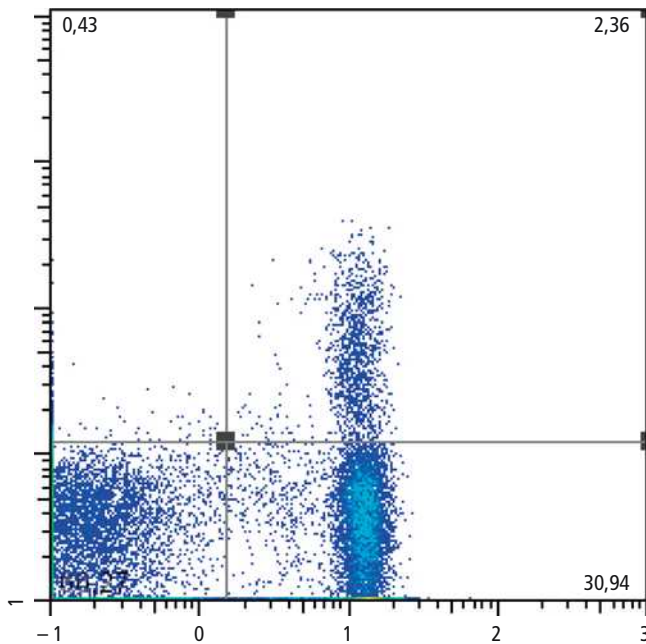


Figure 1-21 Exemple de marquage intracellulaire couplé à un marquage de surface. Après un marquage de surface par un anticorps fluorescent dirigé contre la molécule CD4, on perméabilise les cellules et l'on effectue un deuxième marquage avec un anticorps fluorescent dirigé contre le facteur de transcription Foxp3. On voit que seule la sous-population des lymphocytes T CD4 contient des cellules positives pour le marquage intracellulaire Foxp3ic : il s'agit des lymphocytes T régulateurs.

L'une des principales applications de cette méthode est la détermination de la fréquence des lymphocytes T producteurs de certaines cytokines et, en particulier, l'évaluation du profil T_H1 ou T_H2 . Afin d'augmenter l'intensité du signal, il est usuel d'activer préalablement les lymphocytes par des mitogènes (ester de phorbol + ionomycine), voire par des antigènes en présence de cellules présentatrices, et de bloquer la voie de sécrétion afin de favoriser la rétention intracellulaire des cytokines (bréfeldine). Cette technique peut être couplée à l'analyse des marqueurs de surface, ce qui permet ainsi d'étudier la synthèse d'une cytokine donnée par une sous-population lymphocytaire donnée (Figure 1-22). Parmi les autres applications de la cytométrie intracellulaire, citons également l'analyse de l'activation lymphocytaire par utilisation de molécules sensibles au flux calcique.

Analyse de la spécificité antigénique par les tétramères HLA-peptides [7]

La détermination de la fréquence de lymphocytes T susceptibles de répondre à un antigène donné a longtemps été rendue difficile par l'absence d'une méthodologie permettant de déterminer directement la spécificité d'un TCR. En effet, si un anticorps est généralement capable de se fixer sur un antigène sous sa forme native, les lymphocytes T reconnaissent un peptide présenté par une molécule HLA. Du fait de l'affinité relativement faible des TCR pour les complexes peptides-HLA, il s'est avéré impossible d'utiliser la forme monomérique de ces complexes pour marquer directement les lymphocytes T spécifiques susceptibles de les reconnaître. En revanche, la multimérisation des complexes peptides-HLA permet d'améliorer la force de liaison entre le complexe antigénique et le TCR. On ne parle plus alors d'affinité, mais d'avidité, qui se trouve augmentée par

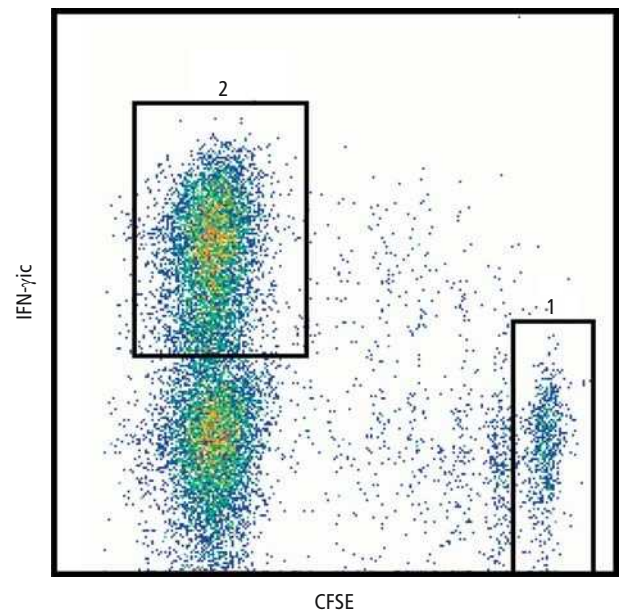


Figure 1-22 Exemple d'analyse couplée de production de cytokine et de division cellulaire. Dans cet exemple, des lymphocytes de souris ont été incubés in vitro avec un marqueur fluorescent (CFSE). Ces cellules ont ensuite été injectées in vivo chez un receveur lymphopénique allogénique où elles vont s'activer et subir des divisions cellulaires. Après quelques jours, on analyse les splénocytes de ces animaux après marquage intracellulaire par un anticorps fluorescent dirigé contre l'interféron γ (IFN- γ). Le cadre 1 indique les cellules parentales qui ne se sont pas divisées : elles conservent un haut niveau de fluorescence et ne produisent pas d'interféron γ . À chaque division, les cellules perdent la moitié de leur fluorescence et se distribuent de droite à gauche suivant une échelle logarithmique en fonction du nombre de divisions qu'elles ont subies in vivo. Au cours de ces divisions témoignant de leur activation, on peut mesurer une sécrétion d'interféron γ . Le cadre 2 représente les lymphocytes ayant subi plus de sept divisions in vivo et sécrétant d'interféron γ , alors que toutes les cellules s'étant divisées ne sont pas sécrétrices de cette cytokine. (Document dû à Diana Mathéoud.)

la multivalence de l'antigène. Les multimères (généralement des tétramères) de molécules HLA sont couplés à un fluorochrome par l'intermédiaire d'un système avidine-biotine et chargés avec un peptide antigénique donné afin de déterminer la fréquence des lymphocytes T spécifiques. Cette méthode est particulièrement utile dans le cas des antigènes présentés aux lymphocytes T CD8⁺ par les molécules HLA de classe I. Elle demeure plus difficile à mettre en œuvre pour les antigènes présentés aux lymphocytes T CD4⁺ par les molécules HLA de classe II. Du fait du polymorphisme des molécules HLA dans la population, l'utilisation de cette méthode est conditionnée à la connaissance préalable des groupes HLA de l'individu étudié et, en pratique, la disponibilité des tétramères est restreinte aux allèles les plus fréquents dans la population comme HLA-A2.

Exemples d'autres applications de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de nombreuses autres applications parmi lesquelles nous donnerons deux exemples : l'analyse de la prolifération cellulaire et l'évaluation de l'apoptose.

Il est possible d'apprécier la prolifération lymphocytaire par plusieurs approches de cytométrie. La première, déjà évoquée, est la

recherche de l'expression de marqueurs de surface liés à l'activation (CD25, HLA-DR, CD69, CD71) mais aussi de marqueurs intranucléaires plus spécifiquement liés au cycle cellulaire (Ki-67, PCNA). Une autre approche consiste à déterminer le contenu en ADN des cellules. Pour cela, les cellules sont perméabilisées puis marquées, non pas avec un anticorps, mais avec un agent intercalant fluorescent comme l'iodure de propidium (IP) qui se lie de façon stœchiométrique à l'ADN. L'analyse de la distribution de fluorescence permet de déterminer la proportion de cellules en phase G_0/G_1 (contenu en ADN = 2N), en phase S ($2N < \text{contenu en ADN} < 4N$) et en phase G_2/M (contenu en ADN = 4N). L'incorporation in vitro d'un analogue nucléotidique comme la bromodésoxyuridine (BrdU) est une autre méthodologie qui permet d'évaluer le nombre de cellules ayant synthétisé de l'ADN pendant un temps donné. Pour cela, on incube les cellules vivantes avec la BrdU (éventuellement après activation par un mitogène ou un antigène), puis on pratique un marquage intracellulaire par utilisation d'un anticorps anti-BrdU fluorescent. Les conditions expérimentales sont importantes dans ce type d'approches car la toxicité cellulaire d'une trop forte concentration de BrdU peut entraîner une sous-estimation de la fréquence des cellules en cycle. Enfin, il est possible d'utiliser un marquage direct des cellules par un fluorochrome comme le CFSE, un ester de carboxy-fluorescéine, suivi d'une activation in vitro. À chaque cycle de division, les cellules perdent alors la moitié de leur fluorescence alors que les cellules quiescentes conservent une intensité de fluorescence maximale. On peut ainsi calculer la fréquence des cellules ayant subi une ou plusieurs divisions (voir Figure 1-22).

Quant à l'apoptose cellulaire, qui se traduit par une fragmentation de l'ADN, il est possible de disposer d'une première estimation par la détermination, après marquage par l'IP, du contenu en ADN inférieur au pic 2N suivant la méthodologie décrite plus haut pour l'analyse du cycle cellulaire. Une autre méthode consiste à coupler un marquage par l'annexine V (qui se lie aux phosphatidyl sérines exposées à la surface des cellules apoptotiques) à un marquage par l'IP qui, en l'absence de perméabilisation membranaire préalable, agit comme un colorant vital qui ne marque que les cellules mortes. Le passage cellules vivantes → cellules pré-apoptotiques → cellules apoptotiques se manifeste alors par une transition de populations annexine V⁻ IP⁻ → annexine V⁺ IP⁻ → annexine V⁺ IP⁺ (Figure 1-23). Enfin, la méthode TUNEL consiste à évaluer l'état de dégradation de l'ADN par l'utilisation d'une enzyme, la désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT), et de nucléotides fluorescents comme le dUTP-fluorescéine. L'accumulation de fragments de dégradation de l'ADN à l'intérieur des cellules se traduit alors par une augmentation de la fluorescence mesurable par le cytomètre.

Autres méthodes d'exploration de l'immunité cellulaire

Réponse proliférative des lymphocytes T

Outre l'analyse de la production de cytokines par les cellules (cytométrie en flux) ou dans les surnageants de culture (ELISA), l'évaluation fonctionnelle des lymphocytes T peut bénéficier de l'exploration de la réponse proliférative de ces cellules après activation in vitro, parfois appelée test de transformation lymphoblastique. On utilise pour cela les cellules mononucléées préalablement séparées par un gradient de densité, car cette suspension contient, outre les lymphocytes T à

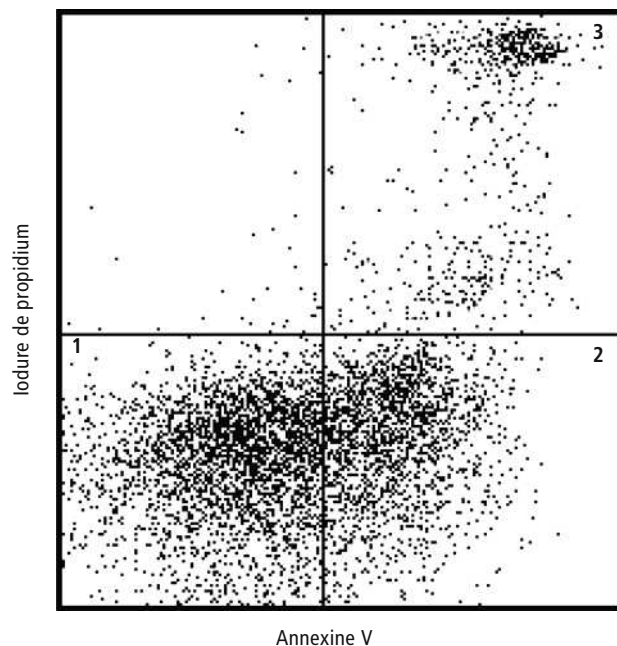


Figure 1-23 Exemple d'étude de l'apoptose par analyse couplée du marquage par l'annexine V et l'iodure de propidium (IP). Dans cet exemple, on a induit l'apoptose de lymphocytes T humains in vitro par un agent chimique. Cela se manifeste par un marquage annexine V⁺ IP⁻ (quadrant 2), puis annexine V⁺ IP⁺ (quadrant 3), alors que les cellules vivantes demeurent annexine V⁻ IP⁻ (quadrant 1). (Document dû à Michel Seman.)

évaluer, des cellules présentatrices d'antigène nécessaires à l'activation. Les activateurs non spécifiques (mitogènes) généralement utilisés sont : des lectines végétales (phytohémmagglutinine) ; des anticorps monoclonaux dirigés contre le TCR et les récepteurs de costimulation (anti-CD3 ± anti-CD28) qui miment la présentation d'un antigène par une cellule présentatrice activée ; des activateurs d'enzymes en présence d'ionophore calcique (ester de phorbol + ionomycine) qui activent directement la protéine C kinase et augmentent la concentration de calcium intracellulaire, un second messenger de l'activation T. On peut également utiliser des activateurs spécifiques comme les antigènes de rappels vaccinaux (tuberculine, anatoxine tétanique) ou environnementaux (candidine, streptocoque), voire des allo-antigènes au cours de cultures lymphocytaires mixtes en présence de cellules mononucléées allogéniques préalablement irradiées pour éviter leur prolifération. Après 2 à 3 jours (activateurs non spécifiques) ou 5 à 6 jours (activateurs spécifiques) de culture, on ajoute un nucléotide radioactif (thymidine tritiée) qui va être incorporé à l'ADN des cellules en division. Après 12 à 18 heures d'incubation, la radioactivité des extraits cellulaires est mesurée. Elle est corrélée positivement, mais sans proportionnalité stricte, à l'importance de la division cellulaire.

Test de cytotoxicité et ELISPOT

Si l'utilisation des tétramères HLA permet de mesurer la fréquence des lymphocytes T susceptibles de reconnaître un peptide donné, elle ne permet pas d'affirmer avec certitude que cette reconnaissance antigénique est suivie de fonction. Aussi peut-il être utile de mesurer la fonction cytotoxique des lymphocytes T in vitro. Pour cela, la méthode de référence consiste à incuber les cellules cibles (par exemple, des cellules auto-logues infectées par un virus donné ou bien des cellules exprimant les

molécules HLA de classe I appropriées et sensibilisées avec un peptide antigénique) avec du chrome radioactif (^{51}Cr). Les lymphocytes à tester sont mis au contact de ces cibles pendant quelques heures, souvent après une étape de restimulation *in vitro* par l'antigène. Le relargage du ^{51}Cr témoigne de la lyse des cellules cibles et donc de l'activité cytotoxique. Une variante consiste à détecter, dans le surnageant de culture, l'activité d'enzymes intracellulaires comme la lactate déshydrogénase, qui témoigne de la lyse des cellules cibles par les lymphocytes T cytotoxiques.

Une autre méthode non radioactive dont les résultats sont fortement corrélés à la cytotoxicité consiste à étudier un paramètre associé à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques, la sécrétion d'interféron γ . Il s'agit de compter, au sein d'une population de lymphocytes T déposés dans une plaque de culture cellulaire, le nombre de cellules productrices de cette cytokine sous l'effet de l'antigène. En effet, chaque cellule répondeuse sécrète l'interféron γ localement et, après lyse cellulaire, on peut détecter cette sécrétion par une variante de la méthode ELISA de type sandwich. Le clone lymphocytaire producteur s'identifie alors par la présence d'un point (ou *spot*), qui a donné son nom à la méthode : ELISPOT. Le développement d'outils automatisés de comptage des points a simplifié l'utilisation de l'ELISPOT qui peut être également appliquée à la détection de cellules productrices d'autres cytokines.

Analyse du répertoire des lymphocytes T

Une connaissance complète du répertoire T consisterait à déterminer la séquence de l'ensemble des récepteurs clonaux des lymphocytes T (chaînes TCR- α et TCR- β) présents à un instant donné au sein du système immunitaire ainsi que le nombre de cellules portant chacun de ces TCR (taille des clones). Cela représenterait plusieurs millions d'informations et demeure évidemment inaccessible en pratique. L'objectif des méthodes d'étude du répertoire T est donc d'offrir une description intelligible de cette complexité en la réduisant à quelques dizaines ou centaines d'informations analysables.

Une première approche consiste à déterminer par cytométrie en flux la répartition des familles de segments TCR-V β utilisées par les lymphocytes T sanguins. Pour cela, on emploie une batterie d'anticorps monoclonaux qui ont été produits contre la majorité des familles de segments TCR-V β , soit environ une couverture de 70 à 80 p. 100 du répertoire T, et l'on détermine le pourcentage de cellules dont les TCR expriment individuellement chacune de ces familles. Une expansion clonale se traduit par une surreprésentation de la famille TCR-V β utilisée par ce clone. Cette approche demeure limitée par le fait qu'elle ne détecte pas les expansions de TCR-V β contre lesquelles on ne dispose pas d'anticorps. Par ailleurs, renseignant uniquement sur la fréquence relative d'une vingtaine de familles.

Une méthode plus discriminante, dite « immunoscope » ou « spectratype » [6], consiste à effectuer une RT-PCR à partir des ARN lymphocytaires afin d'amplifier chacune des familles TCR-V β par l'utilisation d'une amorce *sens* spécifique de cette famille et d'une amorce *antisens* TCR-C β commune à tous les TCR- β . Du fait des réarrangements génétiques aléatoires survenus dans le thymus lors de l'établissement du répertoire T, la région CDR3 du TCR- β qui contribue de façon majoritaire à la reconnaissance du peptide antigénique varie fortement, y compris au sein d'une même famille TCR-V β . Il s'agit non seulement d'une variabilité de séquence, mais aussi de longueur puisque l'on observe des tailles de CDR3 pouvant varier jusqu'à huit acides aminés d'un TCR à l'autre. À l'échelon de l'ARN, cela se manifeste par des messagers dont la taille varie autour d'une taille moyenne. La méthode consiste donc à étudier la distribution de longueur des CDR3 en déposant les produits de RT-PCR spécifiques de chacune des familles

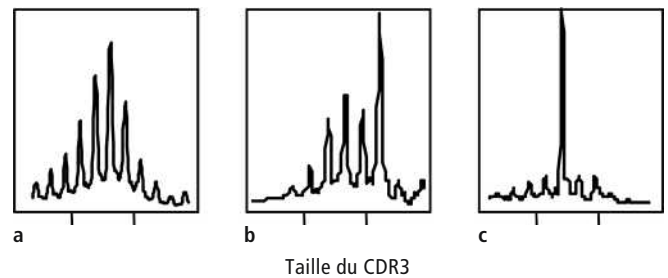


Figure 1-24 Exemple d'analyse du répertoire T par la méthode immunoscope. L'analyse immunoscope permet d'évaluer le répertoire T par l'analyse de la distribution de taille des régions CDR3 de la chaîne β du TCR. Au sein d'une famille TCR-V β donnée, la diversité du répertoire donne une distribution pseudo-gaussienne des tailles de CDR3 (a). Chaque pic est séparé d'une distance de trois nucléotides. Lors de l'expansion d'un clone au sein d'une famille, celui-ci se trouve représenté de façon plus abondante, ce qui se manifeste par un pic dominant (b). Au maximum, on observe un pic quasi unique (c) lorsque l'expansion est très importante.

de TCR-V β sur un gel de polyacrylamide très résolutif, en pratique un gel de séquence capable de discriminer une différence de taille d'un seul nucléotide. Pour un répertoire polyclonal normal, on observe au sein d'une famille TCR-V β donnée, une répartition pseudo-gaussienne des tailles de CDR3 sous la forme de pics séparés les uns des autres par une distance de trois nucléotides correspondant à la conservation du cadre de lecture. Une expansion clonale se manifeste par une augmentation de la taille relative du pic correspondant à la taille du CDR3 du clone surreprésenté. Au maximum, on n'observe plus qu'un pic unique au sein de cette famille (Figure 1-24). Cette méthode globale s'avère particulièrement efficace pour détecter des expansions clonales et elle peut utilement être couplée à l'analyse cytométrique de l'utilisation des familles TCR-V β ou à une analyse de l'abondance de chaque famille TCR-V β par RT-PCR quantitative. On peut ensuite séquencer, si nécessaire, le TCR dont l'expansion aura été détectée par « immunoscope », voire développer une RT-PCR quantitative clonotypique pour suivre la taille de ce clone de façon spécifique au cours du temps, par exemple sous traitement immunosuppresseur.

Ces méthodes d'évaluation du répertoire T peuvent être utiles pour l'analyse de la reconstitution lymphoïde après une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou chez des patients infectés par le VIH sous polythérapie antirétrovirale, pour la détection d'une prolifération monoclonale lymphocytaire T ou pour des études physiopathologiques des maladies auto-immunes.

Recherche d'un mécanisme physiopathologique

L'ensemble des techniques d'exploration de l'immunité humorale et cellulaire permet non seulement d'établir un diagnostic, mais aussi d'identifier le mécanisme en cause au cours d'une affection relevant d'un désordre du système immunitaire. On peut schématiquement considérer trois grandes situations pathologiques, les hypersensibilités, les déficits immunitaires et les syndromes lymphoprolifératifs. Les hypersensibilités sont traditionnellement classées en quatre types présentés dans le tableau 1-XI qui indique aussi les explorations immunologiques correspondantes. Ces explorations se conduisent au mieux avec l'appui des biologistes et, pour certaines d'entre elles, ne se conçoivent que dans le cadre de protocole de recherche clinique.

Tableau 1-XI Classification des mécanismes immunopathologiques.

	Effecteurs	Maladies	Explorations
Type I	IgE, RFcε	Rhinite	Dosage d'IgE spécifiques
	Mastocytes	Conjonctivite	Activation des basophiles
	Basophiles	Asthme	
	Éosinophiles	Anaphylaxie	
Type II	Allo-anticorps	Incompatibilité fœtomaternelle	Recherche d'allo-anticorps
	Auto-anticorps	MAISO MAINSO	Recherche d'auto-anticorps (immunofluorescence indirecte, Western-blot, ELISA)
Type III	Complexes immuns	Vascularites Cryoglobulinémie	Cryoglobuline, latex, Waaler-Rose, complément
Type IV	T CD8 ⁺	Eczéma de contact	Répertoire T, exploration des cytokines, cytotoxicité, tétramères
	T CD4 ⁺ , T reg		
	T CD8 ⁺	Infections virales VHB, VHC	
	T CD4 ⁺ (T _H)	Infections bactériennes intracellulaires (BK), sarcoïdose	
	T CD4 ⁺ (T _H 1)		
	T CD4 (T _H 2)	Asthme, dermatites atopiques	

MAINSO : maladies auto-immunes non spécifiques d'organe; MAISO : maladies auto-immunes spécifiques d'organe.

BIBLIOGRAPHIE

1. BROUET JC, CLAUVEL JP, DANON F et al. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med*, 1974, 57 : 775-788.

2. CONRAD K, TAN EM, HUMBEL RL, SHOENFELD Y. Autoantibodies-diagnostic, pathogenic and pronostic relevance. *Clin Exp Rheumatol*, 1997, 15 : 457-465.

3. FATHMAN CG, SOARES L, CHAN SM, UTZ PJ. An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature*, 2005, 435 : 605-611.

4. FREMEAUX-BACCHI V, DRAGON-DUREY MA, BLOUIN J et al. Exploration du système complémentaire en pratique clinique. *Ann Méd Interne*, 2003, 154 : 529-540.

5. O'SHEA J, PAUL WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 2010, 327 : 1098-1102.

6. RIA F, VAN DEN ELZEN P, MADAKAMUTIL LT et al. Molecular characterization of the T cell repertoire using immunoscope analysis and its possible implementation in clinical practice. *Curr Mol Med*, 2001, 1 : 297-304.

7. SCHWARTZ RS. Direct visualization of antigen-specific cytotoxic T cells : a new insight into immune defenses. *N Engl J Med*, 1998, 339 : 1076-1078.

8. SHAUGHNESSY J Jr. Primer on medical genomics. Part IX : scientific and clinical applications of DNA microarrays : multiple myeloma as a disease model. *Mayo Clin Proc*, 2003, 78 : 1098-1109.

9. TAN EM, SMOLEN JS, MCDUGAL JS et al. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precisions, sensitivity, and specificity. *Arthritis Rheum*, 1999, 42 : 455-464.

GÉNÉTIQUE DES MALADIES SYSTÉMIQUES : MÉTHODOLOGIE ET APPLICATIONS

2 —

Corinne MICELI-RICHARD et Philippe DIEUDÉ

Les maladies systémiques, sont des maladies dites complexes ou multifactorielles, résultant non pas de l'effet délétère d'une mutation fonctionnelle dont la fréquence est rare dans la population générale mais de l'interaction de plusieurs facteurs génétiques avec des facteurs environnementaux. Pris séparément, chaque facteur n'a qu'une contribution modeste au risque génétique global pour une maladie complexe donnée. La difficulté réside dans l'identification des différents facteurs de susceptibilité et de déterminer la combinaison des allèles à risque pour laquelle le risque relatif de développer la pathologie sera le plus élevé. L'étude du déterminisme des maladies systémiques, dont la génétique fait partie, a connu des avancées spectaculaires lors des dix dernières années, permettant une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'apparition du phénotype maladie (*voir* chapitres correspondants). Ainsi, aujourd'hui, la meilleure compréhension de la participation des facteurs génétiques dans le déterminisme des maladies systémiques résulte-t-elle des progrès technologiques mettant à disposition des plates-formes de génotypage à haute cadence à l'origine du génotypage de millions de polymorphismes. De plus, depuis 2003, suite à un effort collaboratif international, le projet HapMap [36] a permis le séquençage complet du génome humain, outil indispensable à l'intégration de la diversité génétique humaine. Dans cette progression fulgurante des connaissances de la génétique de la polyarthrite rhumatoïde, le rôle des cliniciens est majeur, permettant, là encore, à travers des collaborations souvent internationales, la constitution d'échantillons de grande ampleur incluant des milliers de patients et de témoins, prérequis à l'identification de facteurs de susceptibilité. Ces facteurs de susceptibilité ont le plus souvent un poids modeste, inhérent à la nature même de ces pathologies, résultant de l'interaction de facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux (maladies génétiques dites complexes ou multifactorielles).

Problématique des maladies multifactorielles

L'observation de cas d'agrégation familiale de certaines pathologies fait évoquer l'implication de facteurs de susceptibilité génétique. Le but des méthodes d'analyse génétique est d'identifier les allèles de susceptibilité de différents gènes qui, après interaction entre eux dans un

environnement spécifique (facteurs environnementaux), conduisent au développement du phénotype « maladie ».

Cependant, l'identification de ces facteurs génétiques peut-être rendue difficile par une pénétrance incomplète et par l'existence d'une hétérogénéité génétique sous-jacente. La notion d'allèle de susceptibilité traduit l'existence d'un variant génétique augmentant le risque de développer la maladie. Toutefois, cet allèle de susceptibilité n'est pas obligatoirement présent chez tous les malades, de plus, sa fréquence n'est pas nulle chez des individus sains (pénétrance incomplète). Ainsi, en opposition aux maladies monogéniques, les maladies complexes ne sont-elles pas des pathologies héréditaires à transmission simple de type mendélien. Il s'agit de maladies polygéniques qui ne sont pas dues à l'effet délétère d'un gène muté dont la fréquence est rare dans la population générale, mais la conséquence de la présence, chez les patients, d'une combinaison défavorable de plusieurs allèles de susceptibilité de différents gènes sur lesquels l'environnement agit pour induire le processus pathogène. Chacun de ces allèles de susceptibilité, pris séparément, peut avoir une fréquence importante dans la population. C'est donc la combinaison de certains allèles de susceptibilité dans un environnement spécifique qui conduit au phénotype « maladie » (Figure 2-1).

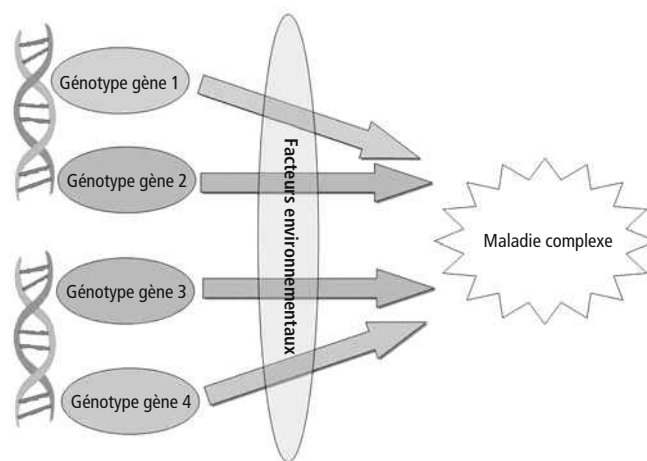


Figure 2-1 Vue schématique de l'interaction facteurs génétiques-facteurs environnementaux concourant à l'émergence d'une pathologie multifactorielle.

Comment évaluer le poids des facteurs génétiques dans le déterminisme d'une maladie multifactorielle ?

L'étude de la composante génétique d'une maladie multifactorielle comporte différentes étapes. La première impose de réunir les arguments suffisants pour supposer l'implication de facteurs génétiques dans la pathologie étudiée. L'observation de formes familiales de la maladie est un premier argument. Mais il peut s'agir de cas familiaux en rapport avec une exposition à des facteurs environnementaux communs à la cellule familiale.

Ainsi l'étape ultérieure devra-t-elle montrer que ces facteurs familiaux sont, en partie au moins, d'origine génétique.

Études familiales

Les études familiales ont pour but de suggérer l'existence d'une composante héréditaire pour une affection donnée par l'observation d'une agrégation familiale des cas. Il s'agit de démontrer qu'il existe une fréquence augmentée de la maladie chez les apparentés du premier degré de sujets atteints (parents, fratrie ou enfants) par rapport à la population générale. On définit ainsi le risque relatif λ_R (« R » pour *relatives* : collatéraux) ou risque de récurrence qui représente le rapport entre la fréquence de la maladie chez les apparentés du premier degré d'un individu malade et la fréquence observée dans la population générale. Ce risque relatif peut être évalué pour différents types de parenté, le plus souvent au sein des fratries (λ_S , « S » pour *sibling*).

Par exemple, au cours de la spondylarthrite ankylosante (SA), dans une étude menée par Calin, la fréquence de la spondylarthrite ankylosante chez les collatéraux HLA-B27 positifs de patients était de 10,6 p. 100 (15/142) et de 1,9 p. 100 (2/108) dans le groupe témoin représenté par les collatéraux HLA-B27 positifs de donneurs de sang sains donnant un risque relatif de spondylarthrite ankylosante chez les collatéraux de sujets malades par rapport à des collatéraux de sujets sains (tous HLA-B27 positifs) de 5,6 (10,6/1,9) [11]. Cette valeur de risque relatif est nommée λ_R , l'indice « R » (relative) se rapportant, dans cette étude, à l'ensemble des collatéraux de premier degré (parents, germains et enfants).

Concernant la polyarthrite rhumatoïde (PR), sa prévalence chez les apparentés du premier degré d'une personne atteinte varie de 2 à 12 p. 100 [23] alors que, dans la population générale, elle varie de 0,2 à 1 p. 100 [90]. Ainsi la valeur de ce paramètre λ_R est-elle évaluée entre 3 et 15 dans la polyarthrite rhumatoïde [24].

Il est important de garder à l'esprit que cette agrégation familiale et donc le paramètre λ reflète à la fois le risque génétique et le risque environnemental apportés par les facteurs partagés au sein d'une famille.

Études de jumeaux

L'étude de jumeaux est la méthode la plus classique et la plus ancienne pour appréhender le poids de la composante génétique d'une maladie.

Ces études permettent d'évaluer le poids de la composante génétique d'une maladie multifactorielle. Elles sont fondées sur l'étude comparative du taux de concordance pour la maladie entre jumeaux monozygotes (partageant les mêmes gènes) et jumeaux dizygotes (partageants des facteurs environnementaux de façon plus étroite qu'une fratrie non gemellaire). Le taux de concordance pour une maladie représente la fraction de paires avec deux jumeaux atteints sur le nombre total de

paires étudiées. En d'autres termes, la concordance évalue la proportion de seconds jumeaux atteints quand le premier est malade. La différence de concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes évalue la contribution génétique à la maladie. Ainsi, plus cette différence est grande, plus la part de la génétique dans la pathogénie de la maladie est grande. Un taux de concordance chez des jumeaux monozygotes différent de 100 p. 100 (c'est toujours le cas pour les maladies multifactorielles) rend compte de l'implication de facteurs environnementaux.

À titre d'exemple, le taux de concordance de la polyarthrite rhumatoïde varie de 12 à 30 p. 100 pour les jumeaux monozygotes, alors qu'il varie de 5 à 10 p. 100 pour les jumeaux dizygotes du même sexe [1]. Le taux de concordance plus élevé chez les jumeaux monozygotes (3 à 4 fois plus élevé en moyenne que chez les dizygotes du même sexe), confirme l'implication de facteurs génétiques dans la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde. L'implication des facteurs environnementaux est également confirmée, puisque ce taux est inférieur à 100 p. 100. Une récente étude Danoise de jumeaux n'a pas répliqué les résultats précédents, suggérant un rôle mineur des facteurs génétiques dans la susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde [101]. Cette étude présente probablement un biais dans le recrutement des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, la prévalence de la maladie (0,15 p. 100) y étant très nettement inférieure à celle attendue. De plus, l'intervalle de confiance du taux de concordance chez les jumeaux monozygotes allait de 0 à 24,7, restant donc largement compatible avec les études précédentes.

Études de liaison génétique : localisation de régions d'intérêt

Les études de liaison génétique ont pour but l'identification de régions chromosomiques ou locus d'intérêts pouvant contenir chacun un, voire plusieurs, gènes de susceptibilité à la maladie. Ces études exploitent les différents polymorphismes de séquence du génome qui ont été mis en évidence au cours des dix dernières années. Les marqueurs polymorphes les plus fréquemment utilisés à l'heure actuelle dans les études systématiques du génome sont les marqueurs microsatellites. Ces derniers correspondent à des répétitions en tandem de courtes séquences nucléotidiques réparties assez uniformément sur le génome et réalisant ainsi un balisage régulier.

Le principe des études de liaison par criblage du génome à l'aide des marqueurs microsatellites est basé sur la distance génétique séparant un locus de susceptibilité et l'un de ces marqueurs microsatellite. Si cette distance est faible, on observera alors une co-ségrégation (co-transmission) d'un des allèles du microsatellite testé dont la localisation est connue avec l'allèle à risque du gène de susceptibilité.

La liaison entre un marqueur génétique et une maladie signifie qu'il y a non indépendance de la transmission du phénotype maladie et du marqueur dans les familles atteintes.

L'étude de liaison permet de localiser les régions du génome (locus) où l'on observe un excès de ressemblance entre germains (frères et/ou sœurs) atteints pour un ou plusieurs marqueurs génétiques, cela avec un degré de vraisemblance statistique plus ou moins grand. L'analyse de liaison nécessite donc l'utilisation d'un matériel familial spécifique, composé d'au moins une paire de germains atteints (frères ou sœurs : *sibling* en anglais) : on parle de familles multiplex ou *affected sib pair* (ASP).

Les criblages systématiques du génome (en anglais *genome scan*) consistent donc à comparer, pour un panel de marqueurs (environ 400 microsatellites habituellement), la répartition des allèles chez les germains atteints (100 à 200 paires de germains en général) par rapport à la distribution attendue selon les lois de Mendel.

La plupart des maladies multifactorielles se caractérisent par des modes de transmission complexes, difficilement modélisables. La

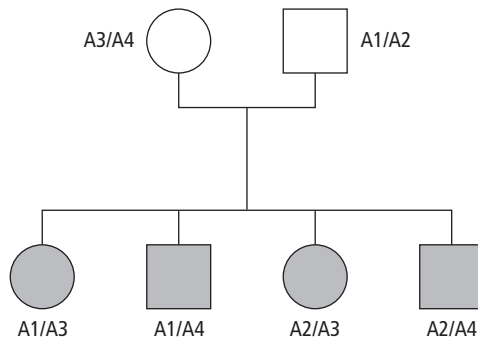


Figure 2-2 Famille multiplex ou *affected sib pair* (ASP). La répartition des quatre génotypes possibles du marqueur multi-allélique A au sein des quatre germains atteints s'effectue selon une probabilité de 25 p. 100 chacun, en accord avec les lois de Mendel.

pénétrance de la maladie et la fréquence des allèles morbides sont extrêmement difficiles à déterminer. Ainsi la recherche des gènes de susceptibilité correspondants doit-elle faire appel à des analyses dites « non paramétriques » ou, plus précisément, « sans spécification de modèle de ségrégation » telle que la méthode des paires de germains, fondée sur le partage d'allèles entre germains atteints.

Le principe de l'analyse de liaison consiste donc à tester si des germains qui ont le même statut phénotypique (phénotype « maladie ») n'ont pas un excès de ressemblance au locus du marqueur testé que s'il y avait ségrégation indépendante entre le marqueur et la maladie (Figure 2-2).

Les allèles A1, A2, A3 et A4 d'un locus A (marqueur microsatellite A) donné, transmis de façon aléatoire selon les lois de Mendel, suivent la répartition suivante au sein de la fratrie.

Selon les lois de Mendel, la probabilité que deux enfants d'une fratrie aient en commun 2 allèles donnés (par exemple, A1 et A3, A1 venant du père et A3 venant de la mère) est de 25 p. 100. La probabilité que les deux enfants se ressemblent pour un seul de ces allèles (par exemple, l'allèle A1 commun aux enfants A1/A3 et A1/A4) est de 50 p. 100 et la probabilité qu'ils ne partagent aucun de ces allèles est de 25 p. 100 (enfants A2/A4) (Tableau 2-1).

Ainsi, pour un marqueur donné et sous l'hypothèse de l'absence de liaison entre le marqueur et la maladie (ségrégation indépendante), les probabilités d'avoir en commun 0, 1 ou 2 allèles sont-elles respectivement de 0,25, 0,5 et 0,25.

Cette distribution théorique est comparée à la distribution observée dans les différentes familles étudiées, par un test du χ^2 , générant une valeur de P pour chaque marqueur. En cas de divergence statistiquement significative entre les deux distributions, on pourra conclure à la liaison génétique. Les résultats sont représentés par une courbe dont chaque point représente un marqueur microsatellite et où l'abscisse est définie par la position du marqueur sur chromosome et l'ordonnée définie par $-\log(P)$ (Figure 2-3). De puissants logiciels permettent la réalisation de

Tableau 2-1 Répartition des quatre génotypes possibles du marqueur multi-allélique A, selon les lois de Mendel.

Mère \ Père	A1	A2
	A1	A2
A3	A1/A3 (25 p. 100)	A2/A3 (25 p. 100)
A4	A1/A4 (25 p. 100)	A2/A4 (25 p. 100)

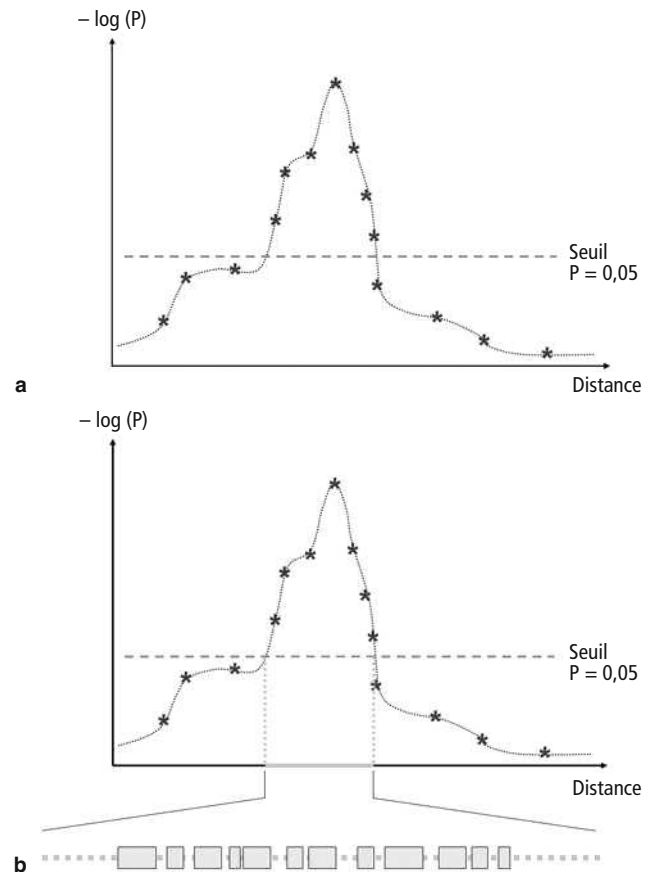


Figure 2-3 Étude de liaison et localisation d'une région d'intérêt. a) Exemple d'analyse de liaison pour un chromosome donné. Analyse réalisée avec quatorze marqueurs microsatellites (astérisques). L'axe des ordonnées correspond à l'opposé du logarithme décimal de la valeur P [$-\log(P)$]. L'axe des abscisses correspond à la distance génétique mesurée en centimorgans (cM) ou physique mesurée en paires de bases (pb). La droite en pointillés correspond au seuil empirique de 5 p. 100. b) Mise en évidence d'une région d'intérêt lors du criblage du génome. La région chromosomique d'intérêt (trait gris) peut contenir plusieurs centaines de gènes (en gris clair) dont un ou plusieurs peuvent être des gènes de susceptibilité.

ce type d'analyse tels que le logiciel Genhunter® qui intègre les données de plusieurs marqueurs simultanément (analyse dite « multipoints »).

Ainsi, dans une famille « multiplex » comportant au moins deux germains atteints, s'attend-on à observer un excès de ressemblance (ou excès d'allèles partagés) dans la fratrie malade pour les allèles des marqueurs situés à proximité du gène de susceptibilité. Ce type d'analyse permet la détermination de locus d'intérêt pouvant contenir un ou plusieurs gènes de susceptibilité à la maladie, cela avec des degrés variables de significativité statistique.

Cette approche a l'immense avantage de s'affranchir d'hypothèse préalable (position des loci notamment). En contrepartie, elle souffre d'un manque de puissance. En outre, au seuil statistique utilisé pour augmenter la sensibilité de cette approche, les loci retenus ne sont que suggérés : beaucoup sont alors de faux positifs. L'existence de faux positifs, c'est-à-dire d'excès de ressemblance entre germains atteints en certains points du génome par le simple fait du hasard (pour un risque α à 5 p. 100 et l'analyse de 400 marqueurs, cette situation sera observée en moyenne pour vingt des marqueurs utilisés lors du cri-

blage systématique), souligne l'importance de la réplication des résultats par des équipes indépendantes travaillant sur des populations génétiquement comparables (caucasiens, par exemple).

D'autres facteurs comme l'hétérogénéité génétique (implication de plusieurs loci dans le développement de la maladie) et le manque de puissance des analyses réalisées (lié à l'implication éventuellement modeste de chaque locus de susceptibilité pris séparément) font que l'absence de liaison dans une région donnée du génome ne permet pas d'exclure définitivement cette région comme potentielle région de susceptibilité à la maladie. Cela explique également la rareté de réplication des résultats des études de liaison génétiques par des équipes indépendantes, en dehors des loci dont l'implication dans le déterminisme génétique pour une affection donnée est très importante et comparable dans les différentes populations étudiées. Ces données rendent ainsi compte de l'énorme complexité du problème et de l'importance de l'effort conjoint de différentes équipes travaillant sur le criblage du génome pour une pathologie donnée.

Études d'association et localisation des gènes de susceptibilité

L'intérêt des études d'associations est qu'elles sont beaucoup plus puissantes que les études de liaison. Elles sont aussi beaucoup plus précises : un marqueur associé à une maladie est soit le facteur génétique *per se*, soit a priori à quelques kilobases (kb) du variant génétique en cause dans la susceptibilité à la maladie, alors que cette distance est de quelques milliers de kilobases pour un marqueur microsatellite lié. Le corollaire, et inconvénient, est que le nombre de marqueurs à étudier est beaucoup plus élevé, limitant l'application à l'étude de gènes candidats ou de locus d'intérêts. Les résultats d'études d'association doivent être interprétés avec prudence. Une réplication des résultats sur des cohortes indépendantes est indispensable. Une confirmation par une étude familiale est nécessaire car cette dernière apporte l'information de liaison. En outre, la mise en évidence d'une association ne permet pas de conclure à l'implication formelle du gène candidat testé. Ce sont les études fonctionnelles des variants associés qui peuvent démontrer le mécanisme physiopathogénique sous-jacent.

Approche gène candidat

Les études d'associations peuvent être utilisées pour tester l'implication de gènes candidats à jouer un rôle dans la susceptibilité génétique à la maladie. Un gène, peut être considéré comme candidat de part sa fonction, de part les possibles implications physiopathologiques d'un variant allélique (polymorphisme fonctionnel), mais aussi de part sa localisation au sein d'un locus d'intérêt préalablement identifié lors du criblage du génome (analyse de liaison). L'approche gène candidat utilise habituellement des polymorphismes bi-alléliques ou SNP (*single nucleotide polymorphism*).

Études cas-témoins

L'approche gène candidat peut se faire selon une étude cas-témoins : des sujets malades non apparentés sont comparés à des sujets sains non apparentés. Les patients et les témoins sont appariés pour la population d'origine, en tenant compte de l'origine ethnique, de manière à ce que les deux groupes ne se distinguent idéalement que par la maladie. L'intérêt des études cas-témoins réside essentiellement dans leur faci-

lité de mise en œuvre. Toutefois, l'étude d'association cas-témoins ne peut éviter le risque majeur de biais de stratification entre les patients et les témoins. L'appariement imparfait a pour conséquence une différence de la distribution des génotypes entre les deux groupes comparés, conduisant éventuellement à un faux positif. Certains auteurs ont proposé l'utilisation préalable d'un panel de marqueurs génétiques connus jouant le rôle d'étalon pour dépister un éventuel biais de stratification entre les deux populations testées, mais cette technique reste controversée [83].

Étude de familles trio

Pour contourner le biais inhérent aux études cas-témoins un modèle d'étude d'association utilisant un échantillon de familles nucléaires ou trio (une personne atteinte et ses deux parents) a été développé. Comme pour les études cas-témoins on prendra soin de s'assurer d'une homogénéité ethnique intra- et interfamiliale pour constituer l'échantillon. Plusieurs tests sont appliqués. L'échantillon constitué de familles trio permet de réaliser deux tests distincts : le test TDT (*transmission disequilibrium test*) [97] et le test GRR (*genotype relative risk*) [33] (Figure 2-4).

Le TDT compare la transmission des allèles du SNP du gène étudié des parents hétérozygotes aux enfants malades avec la loi de Mendel (50 p. 100), en utilisant un test de χ^2 à un degré de liberté. Ainsi un excès de transmission allélique donne-t-il une information de liaison génétique du fait d'une non-indépendance de la transmission allélique et du phénotype maladie.

Le GRR compare la différence de distribution des génotypes du SNP du gène étudié entre les cas et les contrôles (les contrôles correspondent aux génotypes reconstitués à partir des allèles parentaux non transmis), en utilisant un test de χ^2 à deux degrés de liberté. Le GRR apporte une information d'association génétique pour un marqueur donné. On comprend bien l'intérêt d'un tel échantillon familial obérant tout biais de stratification entre le groupe contrôle et le groupe patients, les deux groupes étant parfaitement appariés. Toutefois, ce type d'échantillon familial nécessite le génotypage complet des familles trio (affectés et parents respectifs) et ne permet l'extraction des informations de génotypage que pour les parents hétérozygotes.

Intérêt des familles ASP lors d'études d'association

L'existence de familles au sein desquelles il existe une fréquence accrue de la maladie suggère une possible « concentration » des facteurs génétiques (mais aussi environnementaux). Il apparaît donc intéressant d'utiliser de tels échantillons (type familles multiplex) lors

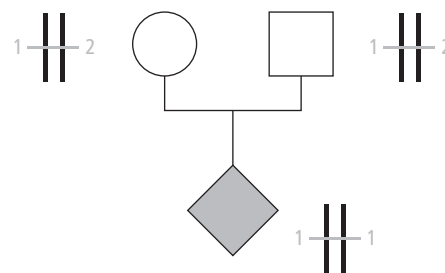


Figure 2-4 Famille trio ou *transmission disequilibrium test* (TDT). On suppose un marqueur bi-allélique (en gris) comprenant les allèles 1 et 2. Chaque parent a transmis l'allèle 1. Le génotype contrôle correspondant au cas index TDT est 2/2 composé des deux allèles parentaux non transmis.

d'étude cas-contrôles, dans l'espoir d'observer une fréquence de l'allèle de susceptibilité beaucoup plus importante que celle qui pourrait être observée dans un échantillon de cas « sporadiques ».

En illustration, de récentes études d'association suggèrent que l'utilisation de tels échantillons familiaux de polyarthrite rhumatoïde pourrait être d'une grande utilité dans la mise en évidence d'un facteur génétique de susceptibilité. Ainsi la fréquence de *HLA-DR4* a-t-elle été trouvée statistiquement supérieure dans un échantillon de 129 polyarthrites rhumatoïdes familiales comparée à celle de 217 polyarthrites rhumatoïdes non familiales (68,2 versus 54,8 p. 100 ; $P = 0,019$) [58]. De même, un polymorphisme du gène *TNFR2* (*TNF receptor 2*) a été associé à la polyarthrite rhumatoïde, restreinte à sa forme familiale, dans deux populations caucasiennes distinctes [5, 31]. Ces études laissent supposer que l'échantillon familial pourrait être d'une grande utilité pour la détection de facteurs génétiques de susceptibilité de maladies complexes. Toutefois, l'utilisation de l'échantillon familial n'obère pas le biais de stratification posé par les études cas-témoins, si bien que les précautions de réplification indépendante et d'argument de liaison restent de mise.

Approche par cartographie fine de déséquilibre de liaison de locus d'intérêt

Pourquoi une cartographie fine ?

Les variants qui sont trouvés le plus fréquemment dans le génome correspondent à des polymorphismes bi-alléliques ou SNP. Ils sont fréquents et abondamment distribués dans tout le génome, la fréquence de ces SNP est supérieure à 1 sur 200 nucléotides. Ainsi les SNP apparaissent-ils particulièrement intéressants pour réaliser une cartographie des maladies multifactorielles. Les études de liaison par criblage du génome avec des marqueurs microsatellites donnent généralement une résolution de localisation de l'ordre de 10 cM, soit environ 10 millions de paires de bases. Pour obtenir une localisation plus précise, il est proposé comme approche la cartographie fine en testant de manière systématique des milliers de SNP. On parle de cartographie fine par déséquilibre de liaison.

Déséquilibre de liaison

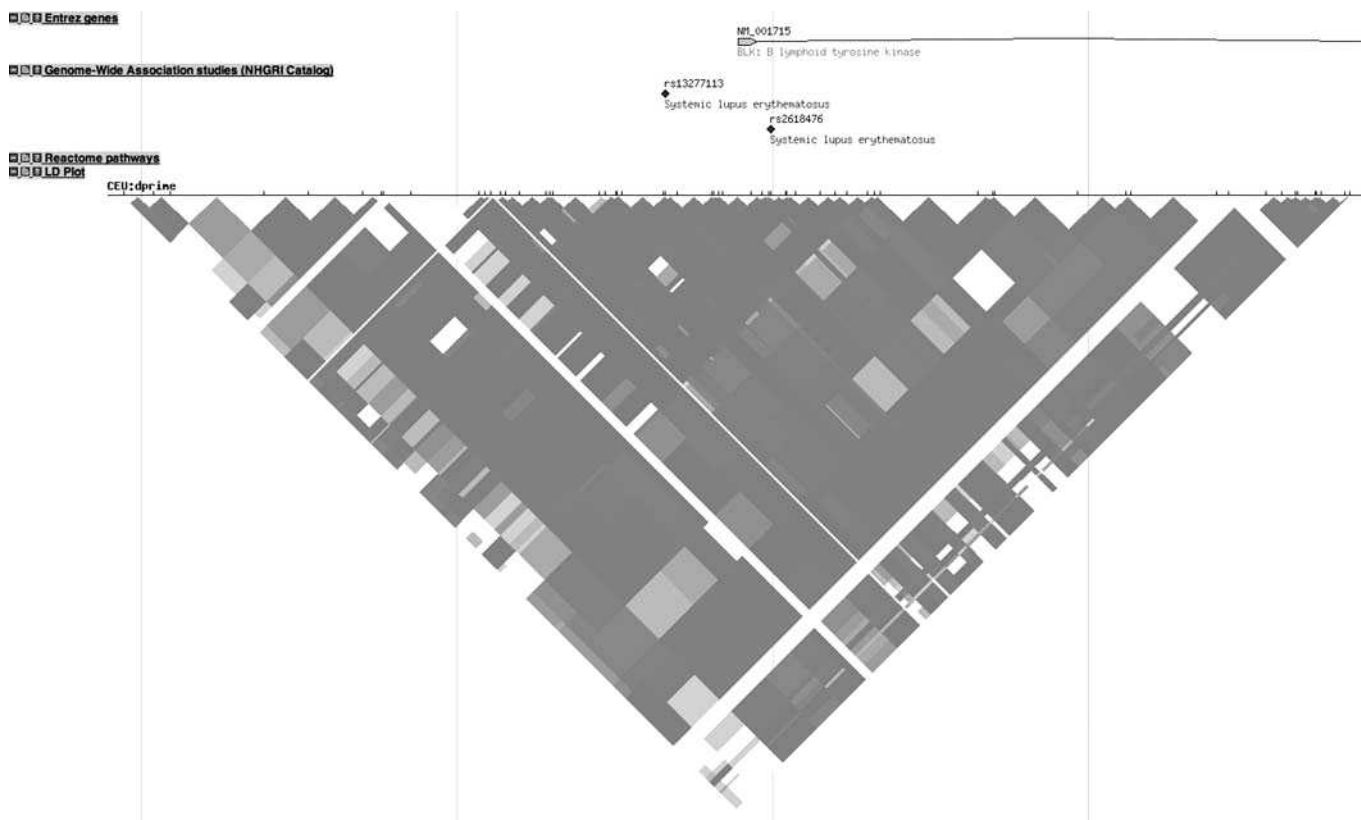
Le déséquilibre de liaison correspond à une association non aléatoire d'allèles liés génétiquement pour lequel certaines combinaisons de variants génétiques se produisent dans différents loci plus fréquemment que ne le laisse prévoir le hasard. En d'autres termes, les SNP tendent à être proches les uns des autres et à être hérités ensemble : on parle de déséquilibre de liaison. Par exemple, tous les individus ayant hérité de l'allèle A du SNP A/G (SNP n° 1) à un endroit donné d'un chromosome ont hérité simultanément de l'allèle T du SNP C/T (SNP n° 2) localisé à proximité du SNP n° 1. Ce déséquilibre de liaison peut ainsi concerner un nombre plus ou moins important de SNP : on parle de blocs de déséquilibre de liaison. Ainsi certaines régions du génome peuvent-elles être définies par l'exploration non pas de tous les SNP compris dans cette portion physique, mais par quelques SNP qui ne sont pas en déséquilibre de liaison et qui appartiennent donc à des blocs de déséquilibre de liaison distincts. Schématiquement, le génome humain correspondrait à un agencement de plusieurs blocs de déséquilibre de liaison.

Réalisation de la cartographie fine par déséquilibre de liaison pour l'ensemble du génome humain : intérêt de l'outil HapMap

Cribler les 10 millions de SNP qui se trouvent dans le génome d'un individu serait une entreprise extrêmement longue et coûteuse. L'existence d'un déséquilibre de liaison entre les SNP permettra de tester un nombre de SNP plus restreint. Pour répondre à cette question un catalogue des variations génétiques les plus fréquentes du génome humain est en cours de constitution. Il décrit la nature des polymorphismes, leur emplacement dans la séquence d'ADN et leur distribution au sein d'une population et entre les populations dans différentes parties du monde. Ce projet international dénommé HapMap est le résultat d'une collaboration entre le Japon, le Royaume-Uni, le Canada, la Chine, le Nigeria et les États-Unis [15]. Cette cartographie, en cours de constitution, est accessible sur internet (<http://www.hapmap.org/index.html>). Ainsi sont définis les principaux SNP « représentatifs » de telle ou telle région du génome (blocs de déséquilibre de liaison), permettant d'explorer de façon plus pertinente et plus efficace les régions d'intérêts pour les maladies multifactorielles. Ces blocs sont représentés par un diagramme reliant chacun des variants par un bloc de couleur dont l'intensité est proportionnelle à l'importance du déséquilibre de liaison (Figure 2-5).

Intérêt de la cartographie fine par déséquilibre de liaison pour la mise en évidence de gènes de susceptibilité des maladies multifactorielles : études GWAS

Le déséquilibre de liaison concerne aussi un SNP et un locus de maladie (facteur génétique de susceptibilité) créant, dans certains cas, une association du marqueur avec le phénotype de la maladie, qui peut être mesurée dans des cohortes cas-témoins. L'étude d'un grand nombre de SNP, soit systématiquement sur l'ensemble du génome (GWAS pour *genome-wide association studies*), soit dans toutes les régions pour lesquelles il semble exister une évidence de liaison, a permis l'identification d'un grand nombre de facteurs de susceptibilité génétique. Le GWAS correspond à une étude d'association cas-témoins, sans hypothèse a priori, testant en une fois plusieurs centaines de milliers d'hypothèses sans nécessiter de pertinence biologique/physiopathologique. Si cette méthode s'est avérée très efficace, elle pose le problème de l'identification d'un très grand nombre d'allèles de susceptibilité, pas toujours répliqués, dont le rôle fonctionnel n'est pas connu, et parfois même situés dans des régions du génome dont la fonction demeure inconnue. Compte tenu du très grand nombre de SNP testées au cours du GWAS, le seuil de signification statistique requiert des valeurs de P inférieures à 10^{-7} . Cette contrainte a pour conséquence l'utilisation d'échantillons de grande taille (habituellement au moins 1 000 patients et 1 000 témoins, pour un odds-ratio voisin de 2), nécessaires à l'obtention d'une puissance de détection pertinente. Ce type d'approche repose sur la théorie de « *common disease, common variant* » qui suppose que des allèles de susceptibilité dont la fréquence n'est pas rare dans la population générale (fréquence de l'allèle mineur > 5 p. 100) interagissent entre eux et probablement avec des facteurs environnementaux, définissant le déterminisme de maladies multifactorielles [47]. En d'autres termes, les allèles à risque d'une pathologie considérée comme fréquente ne sont pas rares dans la population générale. Ainsi, par définition, l'approche GWAS ne permet-elle d'identifier que des polymorphismes supposés fréquents dans la population générale. Si cette hypothèse séduisante a permis de définir le fond de susceptibilité d'un grand nombre de maladies systé-

Figure 2-5 Blocs de déséquilibre de liaison au locus *BLK* (HapMap).

miques telles que le lupus ou encore la polyarthrite rhumatoïde (voir Chapitres 11, 12 et 15) tel que nous le connaissons aujourd'hui, nous verrons que les facteurs de susceptibilité identifiés n'expliquent qu'une faible partie de la composante génétique. Ainsi, l'intervention de variants rares (fréquence de l'allèle mineur < 5 p. 100 dans la population générale), voire de mutations (fréquence de l'allèle mineur < 1 p. 100) pourrait jouer un rôle important dans le déterminisme des maladies systémiques.

Nouvelles approches par séquençage haut débit

Les approches GWAS ont permis de franchir un pas considérable dans l'identification de variants génétiques associés aux maladies auto-immunes ou inflammatoires chroniques : près de 100 variants sont maintenant identifiés comme facteurs génétiques de susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (rectocolite hémorragique et maladie de Crohn) [61] une trentaine dans le lupus [35]. Cependant, la contribution de ces différents variants dans le déterminisme de ces affections reste faible : l'odds-ratio associé à chacun de ces variants est inférieur à 1,5 pour la plus grande majorité d'entre eux. Par ailleurs, les puces utilisées dans les GWAS n'analysent que les variants génétiques fréquents (fréquence de l'allèle rare > 1 p. 100 dans la population générale) et ne permettent pas de mettre en évidence des variants rares ou des mutations spécifiques à chaque affection. Un exemple de ces variants rares peut être décrit pour *Trex1*. Ce gène code une ADN exonucléase. Des mutations et variants rares de ce gène ont été rapportés dans certaines formes de lupus [60]. Leur fréquence est

très faible parmi les témoins (environ 1 sur 1 600) mais beaucoup plus fréquentes chez les sujets lupiques, conduisant à un risque relatif de développer un lupus en cas de portage de ces variants très élevé (OR : 25). C'est désormais vers l'identification de ces variants rares/mutations qu'il faut s'orienter afin de mieux comprendre le déterminisme génétique des affections multifactorielles. Les techniques de séquençage actuelles utilisent des séquenceurs hauts débit (3 Gb en 3 heures...) et des analyses bioinformatiques poussées permettent l'alignement rapide des séquences issues du séquençage. Les approches par séquençage de l'exome (régions codantes du génome et jonctions intron-exon) permettront donc l'identification de ces variants rares afin de mieux appréhender l'ensemble de la composante génétique des maladies multifactorielles.

Applications actuelles de la génétique des maladies systémiques : de la théorie à la pratique...

Les récentes mises en évidence de facteurs de susceptibilité de maladies multifactorielles sont venues souligner la pertinence des méthodes d'approches utilisées pour l'identification de gènes de susceptibilité. Parmi les facteurs génétiques récemment mis en évidence on peut noter *PTPN22* pour le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus, la maladie de Basedow et le vitiligo [6, 9, 12, 56, 107], *CARD15/NOD2* pour la maladie de Crohn [44], *CTLA-4* pour le dia-

bète de type 1 et la maladie de Basedow [106], *PDCD1* pour le lupus et la polyarthrite rhumatoïde [84, 85]. Il est intéressant de noter que la valeur des risques relatifs (RR) inhérents à chaque allèle ou génotype de susceptibilité n'excède pas 3 (résumé *dans* [89]). Cette faible valeur des risques relatifs illustre bien le fait que prise indépendamment, la contribution de chaque gène dans la susceptibilité à une pathologie donnée reste modeste. Par ailleurs, la susceptibilité génétique à une maladie complexe résulte de l'interaction de différents allèles de susceptibilité de différents gènes. Le génotypage de ces marqueurs génétiques ne peut donc pas constituer un test diagnostique.

Nous détaillerons ici deux exemples illustrant les récents succès de la recherche génétique dans l'identification de gènes de susceptibilité des maladies multifactorielles (*CARD15/NOD2* et *PTPN22*), succès obtenus selon deux approches distinctes.

CARD15/NOD2 : facteur génétique de la maladie de Crohn

Le recrutement d'un nombre important de familles multiplex de maladie de Crohn a été réalisé par plusieurs équipes internationales, avec pour objectif la réalisation d'analyses de liaison par criblage du génome entier. Une première analyse de liaison est rapportée par une équipe française en 1996 [46], montrant l'existence d'une région d'intérêt significatif en péri-centromérique du chromosome 16 [45]. Ce résultat a été depuis répliqué par plusieurs équipes indépendantes [13, 40, 78]. L'affinement progressif de cette région par clonage positionnel (cette approche consiste à identifier des gènes dont la fonction et la protéine correspondante sont inconnus, par analyse moléculaire de la région chromosomique où ils sont localisés ; le terme de génétique inverse est parfois utilisé pour décrire cette approche) a conduit cette même équipe française à l'identification du gène *CARD15/NOD2* dans le déterminisme génétique de la maladie au sein de familles européennes de Crohn [44]. De façon simultanée, par une approche gène candidat positionnel, une deuxième équipe a confirmé l'implication de ce même gène dans la population américaine [77]. Ce résultat a depuis été confirmé par de nombreuses équipes [20, 39, 108].

Trois principaux variants alléliques de *CARD15/NOD2* ont été mis en évidence ainsi qu'une trentaine d'autres variants rares dont le rôle fonctionnel n'est toujours pas clairement établi [62]. La protéine CARD15 est une protéine intracellulaire récemment impliquée dans la défense immunitaire innée. CARD15 comporte trois domaines fonctionnels principaux :

- un domaine riche en leucine (LLR pour *leucine rich repeat*) localisé en C-terminal impliqué dans la reconnaissance d'agents pathogènes ;
- un domaine central de liaison à des nucléotides (NBD pour *nucleotide binding domain*) impliqué dans l'oligomérisation de la protéine ;
- le domaine CARD localisé en N-terminal de la protéine jouant un rôle dans l'induction de l'apoptose et l'activation de la voie NF- κ B [76].

CARD15 joue un rôle de surveillance intracellulaire en détectant le muramyl dipeptide (MDP), motif issu de la dégradation des peptidoglycans (PGN) bactériens. La reconnaissance par CARD15 de ces motifs microbiens inhibe en condition physiologique une cascade pro-inflammatoire de signalisation via NF- κ B, nécessaire à la clairance des bactéries pathogènes de l'hôte et induite par la fixation des peptidoglycans par TLR-2 (*Toll-like receptor 2*). CARD15 joue donc un rôle de régulateur négatif naturel de la cascade inflammatoire induite par la reconnaissance à la surface cellulaire de certains motifs bactériens. Le variant allélique de CARD15 le plus couramment rencontré chez les patients atteints de la maladie de Crohn conduit à une protéine tronquée ne détectant plus le MDP. L'effet naturel inhibiteur de CARD15

sur TLR-2 ne peut alors plus être effective et la cascade inflammatoire induite par le couple TLR-2/peptidoglycane est activée.

Ainsi les modifications fonctionnelles de CARD15 pourraient-elles entraîner, au cours de la maladie de Crohn, une incapacité de la muqueuse intestinale à contrôler la réponse inflammatoire massive induite par l'infection bactérienne. Il reste cependant encore beaucoup à comprendre sur le rôle physiopathogénique précis des différents variants alléliques associés à la maladie de Crohn.

Bien qu'il existe un rationnel fonctionnel soulignant le rôle de *CARD15/NOD2* dans la susceptibilité génétique de la maladie de Crohn, il est important de garder à l'esprit que *CARD15/NOD2* est muté chez environ 50 p. 100 des patients atteints de maladie de Crohn contre seulement 20 p. 100 des témoins. Cela démontre que les mutations de *CARD15/NOD2* ne sont ni nécessaires ni suffisantes au développement de la maladie, illustrant bien la contribution d'un facteur génétique pour une maladie multifactorielle où facteurs génétiques et environnementaux interagissent de façon complexe.

Gènes de susceptibilité communs à plusieurs maladies auto-immunes : notion de pléiotropisme

Le gène *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor 22*) code une lymphocyte tyrosine phosphatase (LyP) impliquée dans la régulation négative des lymphocytes T activés. LyP interagit avec la protéine Csk qui exerce une action régulatrice négative sur les lymphocytes T activés. L'action de PTPN22/LyP conduit donc indirectement à un rétrocontrôle négatif de l'activation lymphocytaire T [6, 14, 94]. La protéine LyP est essentiellement exprimée par les cellules de la lignée hématopoïétique notamment les cellules NK et les polynucléaires neutrophiles [6, 14]. Un polymorphisme fonctionnel situé sur le codon 620 qui substitue un résidu arginine (R) par un résidu tryptophane (W) a pour conséquence une diminution de cette régulation négative conduisant à une « auto-activation » lymphocytaire [6].

Selon une approche gène candidat, une première étude d'association cas-contrôles a mis en évidence une association entre l'allèle fonctionnel *PTPN22*620W* et le diabète de type 1 [9]. Cette association sera rapidement confirmée par d'autres études d'associations cas-contrôles [57, 95] et surtout par une preuve de liaison génétique apportée par trois études familiales ASP et TDT confirmant ainsi l'implication certaine du SNP *PTPN22*R620W* dans la susceptibilité génétique du diabète [79, 86, 114].

Une association de l'allèle *PTPN22*620W* à la polyarthrite rhumatoïde a été observée dans une étude nord-américaine cas-contrôles réalisée avec un échantillon initial de 475 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et 475 témoins et un échantillon de réplication composé de 463 patients issus de familles multiplex et de 926 témoins. Des résultats similaires étaient observés avec l'échantillon de réplication [6]. Il est important de noter que *PTPN22* est situé dans un locus d'intérêt suggéré uniquement par le criblage américain [50].

Concernant la polyarthrite rhumatoïde, de multiples études indépendantes ont répliqué l'association entre l'allèle 620W de *PTPN22* et la polyarthrite rhumatoïde [6, 19, 80, 109]. Plus récemment l'argument de liaison génétique a été apporté entre l'allèle 620W et la polyarthrite rhumatoïde, confirmant *PTPN22* comme authentique facteur génétique de susceptibilité de la polyarthrite rhumatoïde [29].

Depuis, l'allèle *PTPN22*620W* a été trouvé associé à de nombreuses autres maladies auto-immunes (MAI) comme le lupus [56, 80], les dysthyroïdies auto-immunes [107], le vitiligo [12] ainsi que les familles où il existe une aggrégation de maladies auto-immunes telles

que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus, le diabète de type 1 ou encore les dysthyroïdies auto-immunes [19]. Il est important de souligner que ces différentes études mettent en avant pour la première fois l'implication d'un facteur génétique fonctionnel commun à différentes maladies auto-immunes, ce qui sous-tend l'existence très probable d'un fond génétique commun prédisposant à l'auto-immunité, déjà suggérée par les criblages génomiques réalisées pour ces différentes pathologies. Toutefois, *PTPN22* n'est pas associé à toutes les maladies auto-immunes, c'est ainsi le cas pour la sclérose en plaques ou encore la maladie de Gougerot-Sjögren [19, 48]. Comme pour *CARD15/NOD2*, la fréquence de l'allèle à risque *PTPN22*620W* dans la population de malades suggère que ce gène n'est ni nécessaire, ni suffisant au développement de l'une des pathologies auto-immunes concernées. La susceptibilité génétique d'une maladie résultant de la combinaison de différents allèles de susceptibilité de différents gènes.

Depuis, de nombreux facteurs de susceptibilité génétiques tels qu'*IRF5*, *STAT4*, *BANK1*, *TNFAIP3*, *BLK* ou encore *IRAK1* ont été décrits comme pléiotropes, c'est-à-dire impliqués dans le fond de susceptibilité génétique d'un grand nombre de pathologie auto-immunes (résumé in [28, 87]).

Épigénétique

Ces dernières années ont été le témoin d'avancées considérables dans le domaine de la génétique des rhumatismes inflammatoires chroniques, notamment pour certaines maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique (LES), la polyarthrite rhumatoïde ou encore la sclérodémie systémique (ScS), conduisant à la mise en évidence d'un grand nombre de facteurs de susceptibilité génétique. À ce jour, le principal facteur de susceptibilité génétique des maladies auto-immunes inclut les gènes du locus *HLA* [63]. Plus récemment, d'autres gènes tels que *PTPN22*, *IRF5* ou encore *STAT4* ont été identifiés comme impliqués dans le déterminisme de nombreuses maladies auto-immunes telles que le LES, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérodémie systémique ou encore le syndrome de Gougerot-Sjögren [22, 30, 37, 69], illustrant le paradigme d'un pléiotropisme des variants à risque. Il est important d'intégrer que les facteurs de susceptibilité génétique ainsi identifiés, ont le plus souvent un poids modeste, inhérent à la nature même du déterminisme des pathologies, résultant de l'interaction de facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux : on parle de maladies génétiques complexes ou multifactorielles. Le rôle fonctionnel de certains de ces variants à risque a été identifié, par exemple, l'allèle de susceptibilité 620W de *PTPN22* est corrélé à une dégradation exagérée de la protéine LyP, conduisant à une hyperactivité des cellules dendritiques et des lymphocytes [112]. En amont des conséquences fonctionnelles d'un allèle de susceptibilité, la contribution d'un gène de susceptibilité peut être modulée par l'environnement. Un nombre important de facteurs de risque environnementaux a été associé à diverses pathologies rhumatismales, telles que l'exposition au tabac, à la silice minérale, les régimes alimentaires ou l'exposition aux rayons ultraviolets. Ces facteurs modulent la régulation épigénétique de notre génome, conduisant à des variations de l'expression des gènes de susceptibilité pouvant entraîner des conséquences fonctionnelles sur différentes voies physiopathologiques. À l'instar d'un chef d'orchestre, les facteurs épigénétiques gouvernent l'interprétation du code génétique à l'intérieur de chaque cellule. Ainsi l'épigénétique pourrait-elle bien être le « chaînon manquant » entre la génétique et l'environnement, expliquant le taux de concordance (proportion de second jumeaux malade quand le premier est atteint) inférieur à 100 p. 100 chez les jumeaux monozygotes (partageant exactement le même matériel génétique) lors de l'étude de la plupart des maladies auto-immunes qui intéressent le

rhumatologue et l'interniste [3]. L'identification de ces facteurs pourrait révolutionner notre compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'émergence des processus dysimmunitaires.

Si l'étude des modifications épigénétiques de tumeurs cancéreuses a permis une meilleure compréhension des mécanismes de régulation épigénétique, conduisant au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le domaine de l'oncologie [32], l'épigénétique des maladies auto-immunes est un domaine de recherche en pleine expansion, avec, encore aujourd'hui, peu de données.

Principaux mécanismes de régulation épigénétique

Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN correspond à une modification chimique s'exerçant de façon exclusive sur la cytosine des dinucléotides CpG. Elle consiste en l'addition d'un groupement méthyle (CH₃) sur cette cytosine [116]. L'essentiel du génome des mammifères est méthylé (98 p. 100). Pour une fraction minoritaire du génome (environ 2 p. 100), la fréquence des CpG est 5 à 10 fois plus grande et ces dinucléotides ne sont pas méthylés. Ces *clusters* de dinucléotides CpG sont appelés « îlots CpG ». Ils sont localisés dans les promoteurs et exons d'environ 40 p. 100 des gènes des mammifères. Ces îlots se trouvent souvent en 5'UTR de gènes domestiques (*housekeeping genes*) et leur état de non-méthylation correspond à l'expression ubiquitaire de ces gènes. Pour les autres gènes, le caractère méthylé ou non méthylé de ces régions explique la spécificité de leur expression tissulaire.

Il a été montré que la méthylation des régions promotrices riches en îlots CpG jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes, en éteignant l'expression de ces gènes par modification de la reconnaissance de séquences cibles de fixation sur l'ADN de facteurs de transcription [8]. Cette méthylation est également impliquée dans les phénomènes d'empreinte génomique (correspond à la variation d'expression d'un gène selon son origine parentale) [34], d'inactivation du chromosome X [81], et dans la carcinogenèse [52].

La méthylation de l'ADN s'effectue par l'intermédiaire d'enzymes appelées DNMT (*DNA methyl transferases*). La DNMT1 est responsable de la « photocopie » des profils de méthylation des cellules au fil des divisions cellulaires. Les DNMT3A et DNMT3B ont pour fonction la méthylation de novo de régions cibles [116]. Le dysfonctionnement de certaines de ces enzymes a été démontré comme étant à l'origine de dérégulations épigénétiques par déméthylation de l'ADN dans les maladies auto-immunes, comme nous le verrons plus loin.

Modifications biochimiques des histones

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est organisé sous forme de chromatine composée d'une succession de nucléosomes. Pour mémoire, chaque nucléosome est composé d'un brin d'ADN double brin (146 paires de bases) s'enroulant autour d'un octamère d'histones. L'octamère d'histones résulte de deux copies des protéines d'histones H2A, H2B, H3 et H4. L'un des mécanismes régulant l'expression d'un gène est l'état de condensation de la chromatine. Celle-ci peut être décondensée (euchromatine), permettant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle, soit condensée (hétérochromatine), et empêchant l'expression d'un gène. Deux types d'activités enzymatiques peuvent être recrutées pour modifier la structure de la chromatine : celles utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour altérer les liens histone-ADN à l'intérieur du nucléosome, et celles qui modifient de façon covalente certains résidus des histones, régulant l'état de condensation

de la chromatine [74]. Ainsi les modifications post-traductionnelles des histones définissent-elles un « code » qui conditionne l'état chromatinien et l'activité de transcription du ou des gènes concernés [51]. Les principales modifications post-traductionnelles connues des histones sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation et la citrullination [27]. Les différentes combinaisons de ces modifications forment le code qui est finalement traduit en un état chromatinien particulier : actif, permissif, restrictif ou inactif.

ACÉTYLATION • L'acétylation, assurée par les histone acétyl transférases (HAT), est un phénomène réversible grâce à l'intervention d'enzymes : les histones désacétylases (HDAC). L'acétylation des lysines à l'extrémité amino-terminale de certaines histones par les HAT a pour conséquence une diminution de l'affinité histone-ADN, stabilisant l'hétérochromatine et favorisant l'accès de la région promotrice du gène à l'ARN polymérase et aux facteurs de transcription (voir Figure 2-1). Le niveau d'acétylation délimite topographiquement l'euchromatine et l'hétérochromatine au moyen d'un gradient d'acétylation/désacétylation [99].

MÉTHYLATION • La méthylation peut survenir sur les lysines ou sur les arginines, permettant de classer les histones méthyltransférases (HMT) selon l'acide aminé concerné. Là encore, les lysines et les arginines ciblées sont en majorité situées sur les extrémités amino-terminales des histones. La méthylation de lysines spécifiques joue souvent, mais non exclusivement, un rôle dans la formation de l'hétérochromatine. De son côté, la méthylation des arginines semble avoir un effet globalement positif sur la transcription [113]. Chez les eucaryotes supérieurs, il a été établi que le nombre de groupements méthyles présents sur un même résidu lysine conduit à différents types de réponses, augmentant ainsi la complexité du code des histones [91].

AUTRES MODIFICATIONS : PHOSPHORYLATION ET UBIQUITINYLATION • La *phosphorylation* peut conduire à des réponses nucléaires très différentes, il est important de noter que cette modification des histones apparaît lors de l'activation transcriptionnelle et lors de la mitose. L'*ubiquitinylation* des histones met en jeu une mono-ubiquitinylation d'un résidu lysine dans le domaine carboxy-terminal des histones. Cette modification exercerait une fonction dans la formation de l'hétérochromatine et la régulation de la transcription.

Les histones peuvent être soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitinylation), chacune de ces modifications pouvant influencer les autres : il existe ainsi une interrelation régulatrice entre les différentes modifications conduisant à la formation du code épigénétique des histones [7]. Enfin, on notera que les modifications des histones peuvent coïncider avec les mécanismes qui régulent la méthylation de l'ADN [10]. Ainsi la complexité de ce code illustre-t-elle un mécanisme sophistiqué modulant l'expression génique de manière fine et spécifique.

MicroARN

Les microARN (miARN) sont de petites molécules d'ARN non codantes longues de 19 à 23 nucléotides régulant négativement l'expression génique par la dégradation ou la répression de leur ARN messenger cible (ARNm) [4]. Les miARN sont présents chez la plupart des espèces et sont impliqués dans plusieurs réponses, notamment le développement, la différenciation et l'homéostasie du système immunitaire [65]. À ce jour, on estime qu'il existe environ 1 500 miARN qui pourraient réguler l'expression d'environ un tiers des gènes codant des protéines, soit plus de 50 p. 100 du génome humain [82].

Les miARN primaires (pri-miARN) sont transcrits par une ARN-polymerase II à partir des gènes miARN. Les pri-miARN sont longs de

200 nt (nucléotides) à plusieurs kilobases et ont une conformation en épingle à cheveux. Au sein du noyau, le complexe Drosha (ribonucléase III)-DGRC8 convertit ce précurseur en pré-miARN de 70 nt, qui est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5. Une fois dans le cytoplasme, l'enzyme Dicer digère le pré-miARN en miARN double brin de 22 nt. Le brin sens se lie au complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), alors que le brin antisens est dégradé. Le complexe RISC-miRNP interagit ensuite avec la région 3'UTR non transcrite de l'ARNm cible. Si la complémentarité est totale, le complexe RISC-miRNP entraîne une dégradation rapide de l'ARNm cible. Si la complémentarité est imparfaite, la traduction de l'ARNm cible est bloquée.

Épigénétique appliquée aux maladies auto-immunes

Lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une affection auto-immune à déterminisme complexe, impliquant des facteurs génétiques et environnementaux. À ce jour, plus de 40 facteurs génétiques ont été rapportés associés au LES. Concernant les facteurs environnementaux, le tabac [17] et l'exposition aux rayons ultraviolets [111] sont les plus fréquemment cités. De façon intéressante, ces deux facteurs environnementaux ont une incidence sur la régulation épigénétique [2, 73].

ÉTUDE DE JUMEAUX MONOZYGOTES ET RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE • Les jumeaux monozygotes peuvent constituer un modèle d'étude du rôle de l'environnement et de la régulation épigénétique dans le déterminisme des maladies auto-immunes. En effet, alors que l'on considère comme identique le patrimoine génétique de deux jumeaux monozygotes, le taux de concordance n'atteint que 24 p. 100 pour le lupus [68]. Cette observation met en exergue le rôle joué par l'environnement et la dérégulation épigénétique comme déterminant majeur de cette affection auto-immune. Dans cette hypothèse, une étude récente a comparé les profils de méthylation de l'ADN de jumeaux monozygotes discordants pour le lupus et ainsi identifié de nombreux gènes d'intérêt potentiellement impliqués dans la pathogénie du lupus via une dérégulation épigénétique [49].

RÔLE DES ANOMALIES DE MÉTHYLATION DE L'ADN • La méthylation de l'ADN étant impliquée dans les phénomènes d'inactivation physiologique de l'un des chromosomes X chez la femme et le LES touchant de façon nettement prédominante la femme (sex-ratio H/F de 1/9), certaines équipes se sont intéressées à la régulation épigénétique de gènes localisés sur le chromosome X. La démonstration d'une déméthylation de CD40L sur le chromosome X inactif conduisant à une surexpression de CD40L dans les lymphocytes T des femmes lupiques en est un exemple récent [67].

On connaît également depuis plus de 20 ans l'existence de lupus induits par des traitements ayant une action déméthylante sur l'ADN, tels que la procainamide et l'hydralazine [16]. De façon similaire, l'ADN des lymphocytes T de patients ayant un lupus actif a été retrouvé hypométhylé de façon globale, induisant une modulation de l'expression de certains gènes comme la perforine, le CD70 ou LFA-1 [53, 66, 88].

Cette hypométhylation de l'ADN des lymphocytes T de patients lupiques peut être en rapport avec un déficit de l'activité enzymatique de la DNMT1. Les agents capables d'induire une déméthylation de l'ADN comme la procainamide ou la 5-azadéoxycytidine sont en fait des inhibiteurs de la DNMT1. Des études complémentaires ont mis en évidence un déficit de signalisation par la voie ras-MAPK au cours

du lupus, cette voie étant impliquée dans l'induction de la DNMT1. Ainsi une inhibition du facteur MEK conduit-elle à une réduction de 50 p. 100 de l'ARNm et de l'activité enzymatique de la DNMT1 sur des lymphocytes T normaux [26, 92]. De façon intéressante, l'hydralazine, qui peut également conduire à des lupus induits, est un inhibiteur de la voie ERK [25]. Il existe donc un rationnel impliquant les phénomènes de régulation épigénétique par méthylation dans le déterminisme du lupus, mais d'autres mécanismes de dérégulation épigénétique ont également été rapportés au cours du lupus.

RÔLE DE L'ACÉTYLATION DES HISTONES • Au cours du LES, on observe de nombreuses modifications des histones, avec un profil d'acétylation spécifique à certains tissus, corrélé à l'activité de la maladie pour certains organes alors qu'un effet protecteur est observé pour d'autres tissus [70, 100].

Il semble que les phénomènes d'hyperacétylation jouent un rôle important au cours du LES. Ainsi a-t-il été montré que le facteur de transcription CREM- α dont l'expression est ubiquitaire est, au cours du lupus, surexprimé dans les lymphocytes T, conduisant à une diminution de l'expression de l'interleukine 2 [18]. Cette répression de la transcription de l'IL-2 s'explique par le recrutement d'HDAC par le CREM- α sur le site de transcription CRE situé dans le promoteur de l'interleukine 2, entraînant une désacétylation des histones réprimant la transcription du gène *IL-2* dans les cellules T [104]. L'importance de l'acétylation dans la physiopathologie du lupus est aussi illustrée par les modèles murins, notamment la suppression de l'activité HDAC de siruini 1 chez la souris, qui conduit à une acétylation des histones H3 et H4, entraînant une réduction du titre d'anticorps anti-ADN et une diminution des dépôts glomérulaire d'IgG [43, 75]. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC, ayant pour conséquence une acétylation sur l'ensemble du génome, entraîne une disparition du phénotype lupus dans le modèle murin MRL-lpr/lpr [70]. Ainsi les phénomènes d'acétylation-désacétylation des histones pourraient-ils jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes physiopathologiques du lupus.

miARN et polyarthrite rhumatoïde

Les miARN ont un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Ils sont nécessaires à la bonne différenciation des cellules immunitaires [65]. Plusieurs études ont montré l'importance des miARN pour la régulation des lymphocytes T régulateurs (Treg) dans la prévention de l'auto-immunité [38]. L'équipe de Zhou a montré que des souris dont les Treg étaient déficients en enzyme Dicer développaient une maladie systémique auto-immune fatale comparable à celle des souris KO *Foxp3*^{-/-} [115]. Chez l'homme, plusieurs études récentes ont suggéré le rôle des miRNA dans les pathologies auto-immunes notamment dans le LES, la sclérose en plaques, les maladies inflammatoires du tube digestif, le diabète de type 1 et le psoriasis [21, 41, 54, 72, 96, 110].

Plusieurs études ont montré une surexpression de miR-146a dans la polyarthrite rhumatoïde dans les synoviocytes arthritiques versus arthrosiques [72], dans le liquide synovial [71] et dans les lymphocytes T CD4⁺ isolés de ce liquide [98]. Le niveau d'expression de miR-146a est beaucoup plus élevé dans les PBMC, le plasma de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde comparés aux sujets sains. Cette augmentation d'expression serait corrélée à l'activité de la maladie [71]. Les niveaux de miR-146a sont corrélés aux taux de TNF- α , d'IFN- α via la voie NF- κ B [102]. Il est intéressant de noter que miR-146a a pour cibles les ARNm de certains gènes identifiés comme facteurs de susceptibilité de la maladie tels qu'*IRF5* et *IRAK1* [42, 103] ou encore le récepteur du TNF- α associé au facteur 6 (TRAF6), suggérant que ce mi-ARN joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de régulation

de l'inflammation. Le mi-ARN miR-155 semble jouer un rôle important dans la polyarthrite rhumatoïde. Son expression est 8 fois supérieure dans les synoviocytes arthritiques comparés au synoviocytes arthrosiques [98]. Là encore l'expression de miR-155 est retrouvée augmentée dans le liquide synovial, le plasma de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde comparé à celui de témoins sains. Il a été noté que miR-155 régulait l'expression de MMP-3 et MMP-1, métalloprotéases impliquées dans le processus de destruction osseuse qui caractérise la maladie [98]. À ce jour, une dizaine de miARN sont dérégulés dans la polyarthrite rhumatoïde. Si ces découvertes nous permettent de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la polyarthrite rhumatoïde, reste à définir l'intérêt pratique de la signature miARN pour un patient donné, comme marqueur diagnostique ou pronostique de la maladie.

Conclusion

Les techniques de biologie moléculaires ont réalisé des progrès considérables au cours de ces dix dernières années, autorisant une approche systématique génétique et épigénétique des maladies multifactorielles. Il est important de garder à l'esprit que nous sommes actuellement aux premières étapes du démantèlement de la génétique des maladies complexes. D'autres formes de variabilité génétique sont très probablement impliquées dans la susceptibilité génétique de ces pathologies : les polymorphismes rares, les variations portant sur le nombre de copies de gène (VCN pour *variable copy number*). Par ailleurs, comme détaillé plus haut, si un grand nombre de variants de susceptibilité sont aujourd'hui identifiés, les conséquences fonctionnelles de l'allèle à risque restent méconnues pour la plupart d'entre eux. Nous sommes actuellement encore loin d'avoir compris et intégré, dans l'étude du déterminisme des maladies systémiques, le rôle des interactions gène-gène (G $\times$ G), de l'épigénétique et des variations somatiques et surtout le rôle de l'interaction gène-environnement (G $\times$ E). Les données épidémiologiques, cliniques et expérimentales convergent donc pour montrer le rôle de la régulation épigénétique dans le déterminisme des maladies auto-immunes. L'épigénétique pourrait ainsi être le chaînon explicatif du rôle des facteurs d'environnement comme le tabac ou l'exposition aux rayons ultraviolets dans le déterminisme de ces affections. Le domaine de l'épigénétique est en pleine explosion. En effet, des progrès technologiques considérables ces dernières années permettent désormais l'étude des profils de méthylation [64] ou de modification des histones [55] à l'échelon du génome. L'identification précise de ces facteurs épigénétiques pourrait révolutionner notre compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent l'émergence des processus dysimmunitaires.

Ce point est essentiel si nous souhaitons identifier au mieux les mécanismes qui sous-tendent l'émergence du phénotype maladie, révélant ainsi un vaste champ de recherche.

BIBLIOGRAPHIE

1. AHO K, KOSKENVUO M, TUOMINEN J, KAPRIO J. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol*, 1986, 13 : 899-902.
2. ALEGRIA-TORRES JA, BACCARELLI A, BOLLATI V. Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*, 2011, 3 : 267-277.
3. BALLESTAR E. Epigenetics lessons from twins : prospects for autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2010, 39 : 30-41.
4. BARTEL DP. MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116 : 281-297.

5. BARTON A, JOHN S, OLLIER WE et al. Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians. *Arthritis Rheum*, 2001, *44* : 61-65.
6. BEGOVICH AB, CARLTON VE, HONIGBERG LA et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 2004, *75* : 330-337.
7. BERGER SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, *12* : 142-148.
8. BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, *16* : 6-21.
9. BOTTINI N, MUSUMECI L, ALONSO A et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*, 2004, *36* : 337-338.
10. BRENNER C, FUKS F. A methylation rendezvous : reader meets writers. *Dev Cell*, 2007, *12* : 843-844.
11. CALIN A, MARDER A, BECKS E, BURNS T. Genetic differences between B27 positive patients with ankylosing spondylitis and B27 positive healthy controls. *Arthritis Rheum*, 1983, *26* : 1460-1464.
12. CANTON I, AKHTAR S, GAVALAS NG et al. A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo. *Genes Immun*, 2005.
13. CAVANAUGH J. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set : Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet*, 2001, *68* : 1165-1171.
14. CHIEN W, TIDOW N, WILLIAMSON EA et al. Characterization of a myeloid tyrosine phosphatase, Lyp, and its role in the Bcr-Abl signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 2003, *278* : 27413-27420.
15. CONSORTIUM TIH. The International HapMap Project. *Nature*, 2003, *426* : 789-796.
16. CORNACCHIA E, GOLBUS J, MAYBAUM J et al. Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol*, 1988, *140* : 2197-2200.
17. COSTENBADER KH, KIM DJ, PEERZADA J et al. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus : a meta-analysis. *Arthritis Rheum*, 2004, *50* : 849-857.
18. CRISPIN JC, TSOKOS GC. Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2009, *8* : 190-195.
19. CRISWELL LA, PFEIFFER KA, LUM RF et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection : the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet*, 2005, *76* : 561-571.
20. CUTHBERT AP, FISHER SA, MIRZA MM et al. The contribution of *NOD2* gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002, *122* : 867-874.
21. DAI Y, HUANG YS, TANG M et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 2007, *16* : 939-946.
22. DAWIDOWICZ K, ALLANORE Y, GUEDJ M et al. The interferon regulatory factor 5 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis and influences its erosive phenotype. *Ann Rheum Dis*, 2011, *70* : 117-121.
23. DEIGHTON CM, WALKER DJ, GRIFFITHS ID, ROBERTS DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet*, 1989, *36* : 178-182.
24. DEL JUNCO D, LUTHRA HS, ANNIGERS JF et al. The familial aggregation of rheumatoid arthritis and its relationship to the HLA-DR4 association. *Am J Epidemiol*, 1984, *119* : 813-829.
25. DENG C, LU Q, ZHANG Z et al. Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. *Arthritis Rheum*, 2003, *48* : 746-756.
26. DENG C, YANG J, SCOTT J et al. Role of the ras-MAPK signaling pathway in the DNA methyltransferase response to DNA hypomethylation. *Biol Chem*, 1998, *379* : 1113-1120.
27. DIEKER J, MULLER S. Epigenetic histone code and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2010, *39* : 78-84.
28. DIEUDÉ P, BOILEAU C, ALLANORE Y. Immunogenetics of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*, 2011, *10* : 282-290.
29. DIEUDÉ P, GARNIER S, MICHOU L et al. Rheumatoid arthritis seropositive for the rheumatoid factor is linked to the protein tyrosine phosphatase non receptor 22-620W allele. *Ann Rheum Dis*, 2005, *64* : 78.
30. DIEUDÉ P, GUEDJ M, WIPFF J et al. Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis : a new perspective for pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum*, 2009, *60* : 225-233.
31. DIEUDÉ P, PETIT E, CAILLEAU-MOINDRAULT S et al. Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis : evidence for genetic heterogeneity. *Arthritis Rheum*, 2002, *46* : 2039-2044.
32. ESTELLER M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 2008, *358* : 1148-1159.
33. FALK CT, RUBINSTEIN P. Haplotype relative risks : an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet*, 1987, *51* : 227-233.
34. FEIL R, KHOSLA S. Genomic imprinting in mammals : an interplay between chromatin and DNA methylation ? *Trends Genet*, 1999, *15* : 431-435.
35. FLESHER DL, SUN X, BEHRENS TW et al. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol*, 2010, *6* : 461-479.
36. FRAZER KA, BALLINGER DG, COX DR et al. A second generation human haplotype map of over 3,1 million SNP. *Nature*, 2007, *449* : 851-861.
37. GRAHAM RR, KOZYREV SV, BAECHELER EC et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, 2006, *38* : 550-555.
38. HA TY. The role of microRNAs in regulatory T cells and in the immune response. *Immune Netw*, 2011, *11* : 11-41.
39. HAMPE J, CUTHBERT A, CROUCHER PJ et al. Association between insertion mutation in *NOD2* gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, 2001, *357* : 1925-1928.
40. HAMPE J, SCHREIBER S, SHAW SH et al. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet*, 1999, *64* : 808-816.
41. HEZOVA R, SLABY O, FALTEJSKOVA P et al. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol*, 2010, *260* : 70-74.
42. HOU J, WANG P, LIN L et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent type I IFN production in macrophages by targeting *TRAF6*, *IRAK1*, and *IRAK2*. *J Immunol*, 2009, *183* : 2150-2158.
43. HU N, LONG H, ZHAO M et al. Aberrant expression pattern of histone acetylation modifiers and mitigation of lupus by SIRT1-siRNA in MRL/lpr mice. *Scand J Rheumatol*, 2009, *38* : 464-471.
44. HUGOT JP, CHAMAILLARD M, ZOULALI H et al. Association of *NOD2* leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001, *411* : 599-603.
45. HUGOT JP, LAURENT-PUIG P, GOWER-ROUSSEAU C et al. Linkage analyses of chromosome 6 loci, including HLA, in familial aggregations of Crohn disease. *G.E.T.A.I.D. Am J Med Genet*, 1994, *52* : 207-213.
46. HUGOT JP, LAURENT-PUIG P, GOWER-ROUSSEAU C et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, 1996, *379* : 821-823.
47. ILES MM. What can genome-wide association studies tell us about the genetics of common disease ? *PLoS Genet*, 2008, *4* : e33.
48. ITTAH M, GOTTENBERG JE, PROUST A et al. No evidence for association between 1858 C/T single-nucleotide polymorphism of *PTPN22* gene and primary Sjogren's syndrome. *Genes Immun*, 2005, *6* : 457-458.
49. JAVIERRE BM, FERNANDEZ AF, RICHTER J et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res*, 2010, *20* : 170-179.
50. JAWAHEER D, SELDIN MF, AMOS CI et al. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes : a replication study and