

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE : ANTICORPS ANTI-PROTÉINES ET PEPTIDES CITRULLINÉS : LA SAGA CONTINUE

Sylvain Dubucquoi ^a

Une publication récente montre que les habitudes des rhumatologues pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde (PR) changent. En 2003, plus de 85 % des spécialistes recherchent désormais cette pathologie en présence d'une monoarthrite évoluant depuis moins de 3 mois [1]. En effet si, une fois assemblés, les critères de l'ACR permettent de poser le diagnostic de PR avec quasi-certitude [3], il peut être trop tard pour espérer une efficacité thérapeutique optimale [12]. La prise en charge de la PR doit donc être considérée avec une relative urgence [13], dans laquelle la biologie a désormais sa place.

Certains éléments nous encouragent, nous aussi biologistes, à changer nos pratiques quotidiennes dans ce domaine. Vers 2002, ont été commercialisés de nouveaux tests performants pour le diagnostic de la PR : les coffrets ELISA dosant les anticorps (Ac) anti-peptides cycliques et citrullinés (anti-CCP). Ces trousse offrent, outre la simplicité d'emploi, d'excellentes performances de spécificité, et une sensibilité au moins comparable à celle des facteurs rhumatoïdes (FR). A l'heure actuelle, si les anti-CCP ne peuvent remplacer les dosages de FR, ils proposent en revanche une complémentarité intéressante, puisqu'il apparaît que la combinaison des anti-CCP et des FR offre des performances optimales pour le diagnostic de PR [7]. Nous présentons ici quelques éléments de réflexion qui pourraient être utiles pour choisir, en 2006, un coffret de dosage d'Ac anti-protéines citrullinées (ACPA).

L'année dernière, la gamme des coffrets commerciaux permettant de doser les Ac dirigés contre des antigènes citrullinés (protéiques ou peptidiques, cycliques ou non) s'est largement diversifiée. Quatre (bientôt cinq) nouveaux coffrets s'ajoutent dorénavant aux méthodes « conventionnelles » des microplaques ELISA dosant les Ac anti-CCP, déjà appelées « tests de seconde génération » (CCP2) et qui utilisent toutes la même source antigénique commercialisée par la société néerlandaise Eurodiagnostica. Certains nouveaux coffrets utilisent encore cette source antigénique, alors que d'autres proposent d'évaluer la réactivité sérique dirigée contre de nouvelles cibles antigéniques citrullinées [8].

Notre laboratoire a pu évaluer certaines des nouvelles trousse commercialisées. L'étude a été réalisée à partir de 279 sérums. Les populations étudiées étaient composées d'une cohorte de 134 patients souffrant de PR : 107 patients ayant une PR depuis **plus de 2 ans** (PR « installée ») et 27 patients dont les sérums ont été recueillis alors que les symptômes évoluaient depuis **moins de 6 mois** (PR « précoces »), enfin d'une population témoin composée de donneurs de sang (n = 37), de lupus érythémateux systémiques (n = 40), de maladies primaires de Sjögren (n = 33), de connectivites mixtes et indifférenciées (n = 33). Nous avons mesuré

les performances (en terme de sensibilité et spécificité) des trousse distribuées en France par Diasorin (Eurodiagnostica, anti-CCP2), Genesis (anti-CPA[®]), Menarini (Inova, anti-CCP2 et anti-CCP3), Orgentec (anti-MCV[®]), Pharmacia (anti-CCP2). Les comparaisons des trousse ont été réalisées aux seuils proposés par les fournisseurs, mais également à l'aide de courbes ROC qui permettent potentiellement de définir un seuil « optimal » correspondant au maximum de l'indice de Youden (I. Youden = sensibilité + spécificité - 1) [6].

Le détail des résultats de sensibilité et spécificité de chaque coffret est donné dans les *tableaux I et II*, en fonction des populations. Aux seuils définis par les fournisseurs de réactifs, on notera que les performances sont globalement équivalentes entre les coffrets utilisant les peptides cycliques et citrullinés de 2^e génération (CCP2) et les nouvelles générations de tests qui n'utilisent pas cet antigène. Dans une certaine mesure, certaines trousse de nouvelle génération offrent des performances supérieures, pour un diagnostic précoce de PR, notamment le coffret dosant les Ac anti-vimentine mutée et citrullinée (anti-MCV[®], Orgentec). On voit en effet que ce coffret est aussi sensible pour le diagnostic de la PR au début de son évolution qu'une fois que la pathologie est installée depuis plusieurs années. La sensibilité (et l'indice de Youden) des autres coffrets est en général plus faible pour les PR récentes que pour les PR anciennes (*tableau II*).

Nous avons d'autre part observé, au vu de l'allure des courbes ROC et des « aires sous la courbe » qui en découlent pour chaque trousse (*figure 1 et tableau III*), que certains coffrets dosant les Ac anti-CCP2 (notamment celui d'Eurodiagnostica) semblent plus performants à condition de réévaluer leur seuil à la baisse (*tableau III*).

Il n'est jamais aisé pour un biologiste de prendre sur lui de modifier un seuil proposé par un fournisseur, seuil certainement défini après la prise en compte de nombreux paramètres qui peuvent échapper à l'utilisateur (manipulations manuelles ou automatisées, expérience du manipulateur...). Nous avons toutefois tenté d'appliquer cette démarche au coffret que nous utilisons dans la routine de notre laboratoire (anti-CCP de 2^e génération, Inova). Il apparaît que la division par 2 du seuil de cette trousse modifie significativement ses performances pour une population de patients du Service de rhumatologie de Lille (1 370 demandes de septembre 2002 à juillet 2005, dont plus de 650 statuts cliniques renseignés parmi lesquels 335 PR). Avec ce seuil réévalué, la sensibilité de la trousse passe de 71,3 à 79,1 %. Pour les patients dont la PR est diagnostiquée au tout début de l'évolution (n = 42), la sensibilité passe de 69 % à plus de 76 %. La spécificité évolue toutefois de 95,1 à 83 % (résultat proche de celui observé dans notre enquête). La question se pose alors de savoir s'il est intéressant de gagner de 7 à 8 points de sensibilité pour perdre 12 points de spécificité. L'indice de Youden peut répondre puisqu'il évolue de 66,43 (seuil à 20 UI/ml) à 62,1 (seuil à 20 UI/ml), montrant que ce coffret ne bénéficierait certainement pas d'une telle réduction du cut-off. Cette question de réévaluation du seuil mérite peut-être d'être posée pour des trousse offrant des spécificités supérieures, comme illustré dans le *tableau III*.

^a Laboratoire d'immunologie
Centre hospitalier universitaire de Lille
59037 Lille cedex

Correspondance
s-dubucquoi@chru-lille.fr

4^e Colloque GEAI

Un dernier point mérite d'être soulevé devant la diversification des trousse d'ACPA : peut-il être utile de combiner les dosages utilisant des cibles citrullinées de nature différente pour augmenter encore les performances de sensibilité des trousse, sans perdre de leur spécificité ? Nous prendrons deux exemples. A partir de notre cohorte, nous avons observé que la sensibilité pour le diagnostic de la PR gagne plus de 10 points quand on combine un dosage ELISA anti-CCP2 à la recherche des Ac anti-MCV® (Orgentec). Elle passe de 58 à 69,6 % pour Eurodiagnostica, et de 64,5 à 76,8 % pour INOVA, aux seuils

définis par les fournisseurs. La spécificité de ces trousse ne chute que de 4 points (de 95,1 à 90,8 % pour Eurodiagnostica, et de 86,6 à 82,4 % pour Inova). Par comparaison, la combinaison des mêmes coffrets de dosage des Ac anti-CCP2 avec un dosage des FR offre des performances moindres, principalement liées à l'altération de la spécificité d'une telle combinaison (pour Eurodiagnostica, la sensibilité passe de 58 à 63,3 %, la spécificité de 95,1 à 57 % ; pour INOVA, si la sensibilité passe de 64,5 à 81,3 %, la spécificité chute de 86,6 à 53,5 %). La diversification des trousse commerciales apporte l'es-

Tableau I / Sensibilité et spécificité de différentes trousse de dosage des anticorps anti-protéines ou peptides citrullinés dans une population souffrant de PR depuis plus de 2 ans (n = 107) et une population témoin (n = 145).

PR > 2 ans versus contrôles	Seuil*	Sensibilité % (intervalle de confiance 95 %)	Spécificité % (intervalle de confiance 95 %)	Indice de Youden
CCP2 Eurodiagnostica	25	58,7 (48,9-68,1)	95,8 (91,1-98,4)	54,5
CCP2 INOVA	20	66,4 (57,3-74,7)	87,7 (81,2-92,5)	54,1
CCP2 Pharmacia	10	65,3 (55,9-73,8)	92,7 (87,0-96,4)	58,0
CPA® (Genesis)	6,25	64,5 (54,6-73,5)	86,2 (79,5-91,4)	57,0
CCP3 (INOVA)	20	63,9 (54,1-72,9)	93,7 (88,3-97,1)	57,6
MCV® (Orgentec)	20	57,4 (47,5-66,9)	96,5 (92,0-98,8)	53,9

* Seuil proposé par le fournisseur.

Les performances ont été calculées aux seuils définis par les fournisseurs de réactifs. Elles sont globalement équivalentes entre les coffrets (indice de Youden).

Tableau II / Sensibilité et spécificité de différentes trousse de dosage des anticorps anti-protéines ou peptides citrullinés dans une population souffrant de PR depuis moins de 6 mois (n = 27) et une population témoin (n = 145).

PR > 6 mois versus contrôles	Seuil*	Sensibilité % (intervalle de confiance 95 %)	Spécificité % (intervalle de confiance 95 %)	Indice de Youden
CCP2 Eurodiagnostica	25	53,3 (34,3-71,6)	95,8 (91,1-98,4)	49,1
CCP2 INOVA	20	56,7 (37,4-74,5)	87,7 (81,2-92,5)	44,4
CCP2 Pharmacia	10	53,3 (34,3-71,6)	92,7 (87,0-96,4)	46,0
CPA® (Genesis)	6,25	46,4 (27,5-66,1)	86,2 (79,5-91,4)	32,6
CCP3 (INOVA)	20	53,3 (34,3-71,6)	92,3 (86,6-96,1)	45,6
MCV® (Orgentec)	20	56,7 (37,4-74,5)	96,5 (92,0-98,8)	53,2

* Seuil proposé par le fournisseur.

Certains coffrets voient leur sensibilité chuter quand on s'intéresse à cette population de patients (les performances ont été calculées aux seuils définis par les fournisseurs de réactifs). Ce phénomène pourrait être lié à la capacité (ou non) des trousse à doser les Ac de faible affinité, dont on peut imaginer qu'ils prévalent au tout début de la PR.

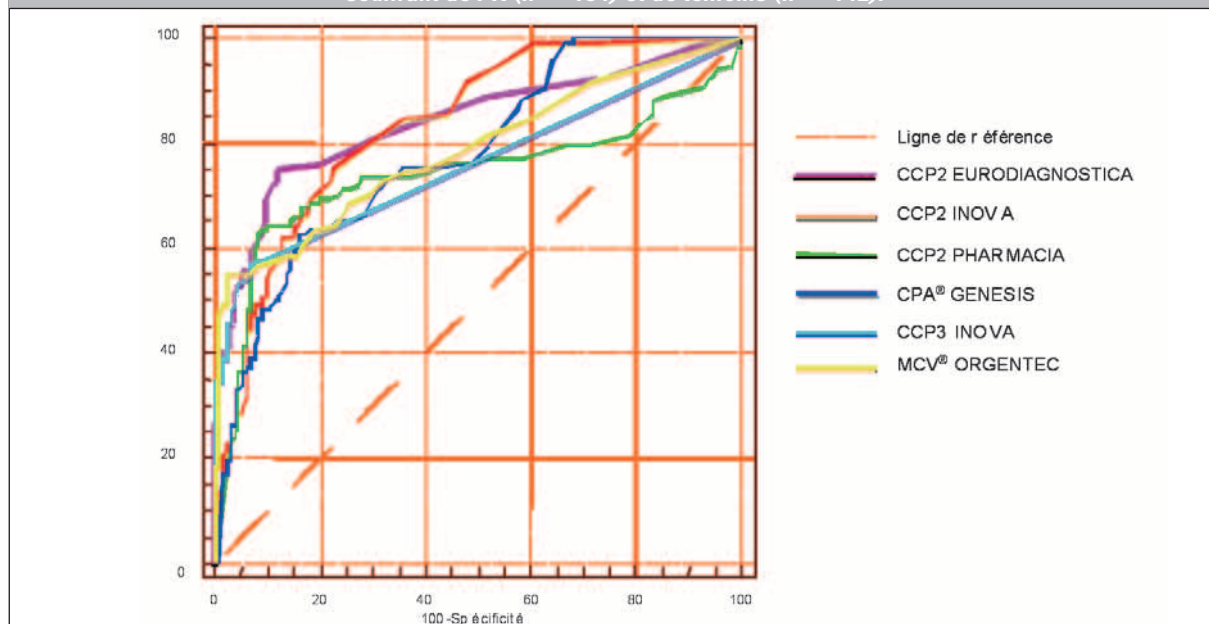
Tableau III / Sensibilité et spécificité de différentes trousse de dosage des anticorps anti-protéines et peptides citrullinés dans une population souffrant de PR (n = 134) et une population témoin (n = 145).

PR (tous stades confondus) versus contrôles	Seuil*	Sensibilité % (intervalle de confiance 95 %)	Spécificité % (intervalle de confiance 95 %)	Indice de Youden	Aire sous la courbe (intervalle de confiance 95 %)
CCP2 Eurodiagnostica	5	77,0 (68,6-84,0)	87,8 (81,1-92,7)	64,8	0,844 (0,793-0,886)
CCP2 INOVA	8	77,6 (70,2-84,0)	78,1 (70,5-84,5)	55,7	0,837 (0,786-0,881)
CCP2 Pharmacia	7,4	68,2 (60,1-75,6)	91,2 (85,2-95,4)	59,4	0,741 (0,682-0,794)
CPA® (Genesis)	5	64,4 (55,8-72,5)	84,8 (77,9-90,2)	49,2	0,781 (0,725-0,831)
CCP3 (INOVA)	22	60,9 (52,2-69,1)	93,7 (88,3-97,1)	54,6	0,761 (0,703-0,813)
MCV® (Orgentec)	20	57,2 (48,5-65,6)	96,5 (92,0-98,8)	53,7	0,787 (0,731-0,836)

*Seuil défini en fonction du maximum de l'indice de Youden = sensibilité + spécificité - 1.

Les performances ont été calculées aux seuils définis par le maximum de l'indice de Youden [6]. Il apparaît que les seuils de certaines trousse définis par les fournisseurs ont peut-être été surévalués.

Figure 1 / Performances de différentes trousse de dosage des anticorps anti-protéines ou peptides citrulinés par la méthode des courbes ROC dans la population constituée de patients souffrant de PR (n = 134) et de témoins (n = 142).



Si l'ensemble des coffrets présente des performances globalement comparables, les trousse de microplaques ELISA utilisant les peptides cycliques et citrulinés (CCP2) présentent des « aires sous la courbe » parmi les plus importantes (voir tableau III).

perance d'amélioration des performances de la recherche des Ac anti-protéines citrulinées, et, par là même, d'une plus large diffusion de ce type de test. Si, à l'heure actuelle, les nouvelles trousse ne supplantent pas encore la génération précédente (anti-CCP2), il est clair qu'elles offrent une alternative tout à fait intéressante, qui ne peut qu'aider encore à la généralisation de ce test, et peut-être à une réduction des coûts liés à ces dosages. Des études complémentaires permettront de préciser s'il est utile de combiner différents tests pour en améliorer les performances. Plus encore, tout laisse penser que d'autres coffrets encore sont en gestation : fibrine, peptides viraux, télopeptides du collagène sont autant d'antigènes citrulinés qui pour-

raient constituer des cibles intéressantes pour la recherche des Ac associés à la physiopathologie de la PR [9, 10, 11]. L'enjeu est de taille car on peut s'attendre à une véritable explosion des prescriptions dans les prochains mois. Au vu des dernières publications, il apparaît que la diminution des titres des ACPA pourrait refléter l'efficacité des thérapies proposées pour la PR, faisant des ACPA non seulement des marqueurs diagnostiques et pronostiques (marqueurs d'érosion) mais maintenant des marqueurs d'efficacité thérapeutique [2, 4, 5].

Alors, peut-on espérer qu'en 2006 les dosages des Ac anti-protéines ou peptides citrulinés seront enfin inscrits à la Nomenclature des actes de biologie médicale ?

Références

- [1] Aletaha D., Eberl G., Nell V.P.K., Machold K.P., Smolen J.S., Attitudes to early rheumatoid arthritis: changing patterns, Results of a survey, *Ann. Rheum. Dis.* 63 (2004) 1269-1275.
- [2] Aotsuka S., Okawa-Takatsuji M., Nagatani K., Nagashio C., Kano T., Nakajima K. et al., A retrospective study of the fluctuation in serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Exp. Rheumatol.* 23 (2005) 475-481.
- [3] Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A., McShane D.J., Fries J.F., Cooper N.S. et al., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 31 (1988) 315-324.
- [4] Atzeni F., Sarzi-Puttini P., Dell'Acqua D., de Portu S., Cecchini G., Cruini C. et al., Adalimumab clinical efficacy is associated with rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide antibody titer reduction: a one-year prospective study, *Arthritis Res. Ther.* 8 (2005) R3.
- [5] Chen H.A., Lin K.C., Chen C.H., Liao H.T., Wang H.P., Chang H.N. et al., The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 65 (2006) 35-39.
- [6] Delacour H., Servonnet A., Perrot A., Vigezzi J.F., Ramirez J.M., La courbe ROC (receiver operating characteristics) : principes et principales applications en biologie clinique, *Ann. Biol. Clin.* 63 (2005) 145-154.
- [7] Dubucquoi S., Solau-Gervais E., Lefranc D., Marguerie L., Sibilia J., Goetz J. et al., Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 63 (2004) 415-419.
- [8] Humbel R.L., Olsson N.O., Le point sur les autoanticorps anti-protéines et anti-peptides citrulinés, *Biotribune.* 17 (2005) 34-36.
- [9] Koivula M.K., Aman S., Karjalainen A., Hakala M., Risteli J., Are there autoantibodies reacting against citrullinated peptides derived from type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* 64 (2005) 1443-1450.
- [10] Masson-Bessiere C., Sebbag M., Girbal-Neuhauser E., Nogueira L., Vincent C., Senshu T. et al., The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deaminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin, *J. Immunol.* 166 (2001) 4177-4184.
- [11] Merlini G., Anzilotti C., Chimenti D., Tommasi C., Bombardieri S., Migliorini P., A deaminated viral peptide to detect antibodies in rheumatoid arthritis, *Ann. NY Acad. Sci.* 1050 (2005) 243-249.
- [12] O'Dell J., Treating rheumatoid arthritis early: a window of opportunity? *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 283-285.
- [13] Visser H., Le Cessie S., Vos K., Breedveld F.C., Hazes J.M., How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 357-365.