Pneumopathies infiltrantes diffuses: Quels anticorps et pourquoi?

Dr Makoto MIYARA
APHP-Département d'immunologie
APHP-Médecine interne
Centre de référence lupus et syndrome des antiphospholipides

Pourquoi?

- Orientation diagnostique devant une PID
  - Connectivites
  - Myopathies inflammatoires

- Urgences
  - Hémorragies alvéolaires➔APL, ANCA
  - Réanimation➔Une nouveauté
- Biologie prédictive

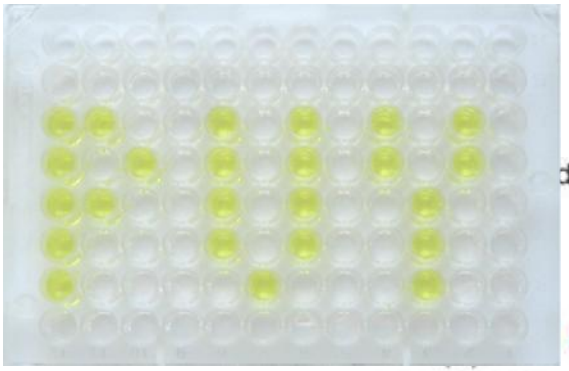
Orientation diagnostique devant une PID
Connectivites

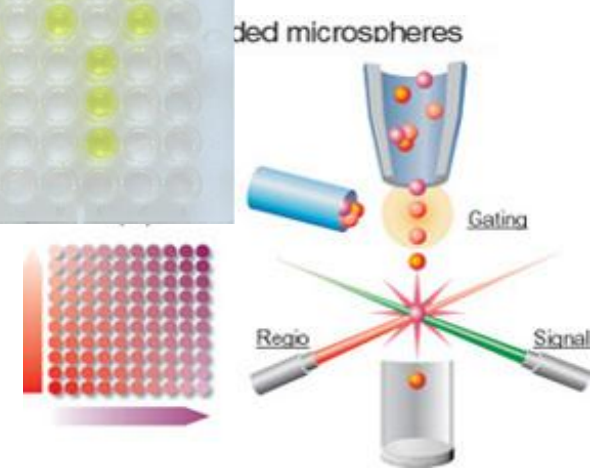
- Sjögren
- Sharp
- Sclérodermies

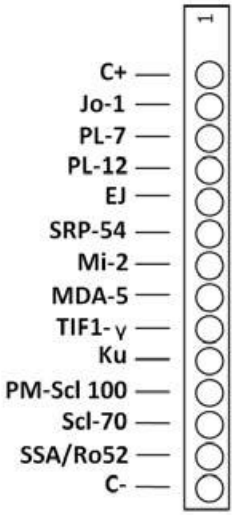
Dépistage

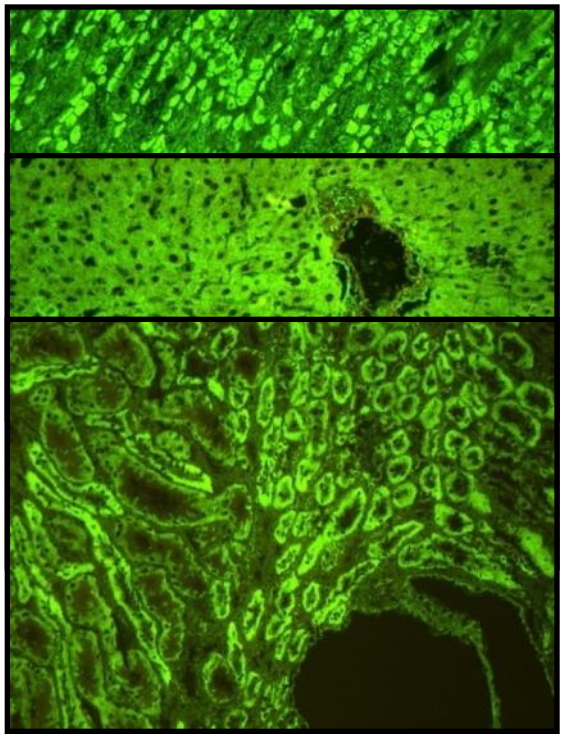
IFI : aspect, titre

- **Identification :** technique ELISA (ADN,ECT)
- **Identification :** technologie Luminex® (ECT)
- **Identification :** Immunodots
- **Identification :** IFI sur coupe de tissus









Immunofluorescence sur cellules Hep-2

Immunofluorescence indirecte

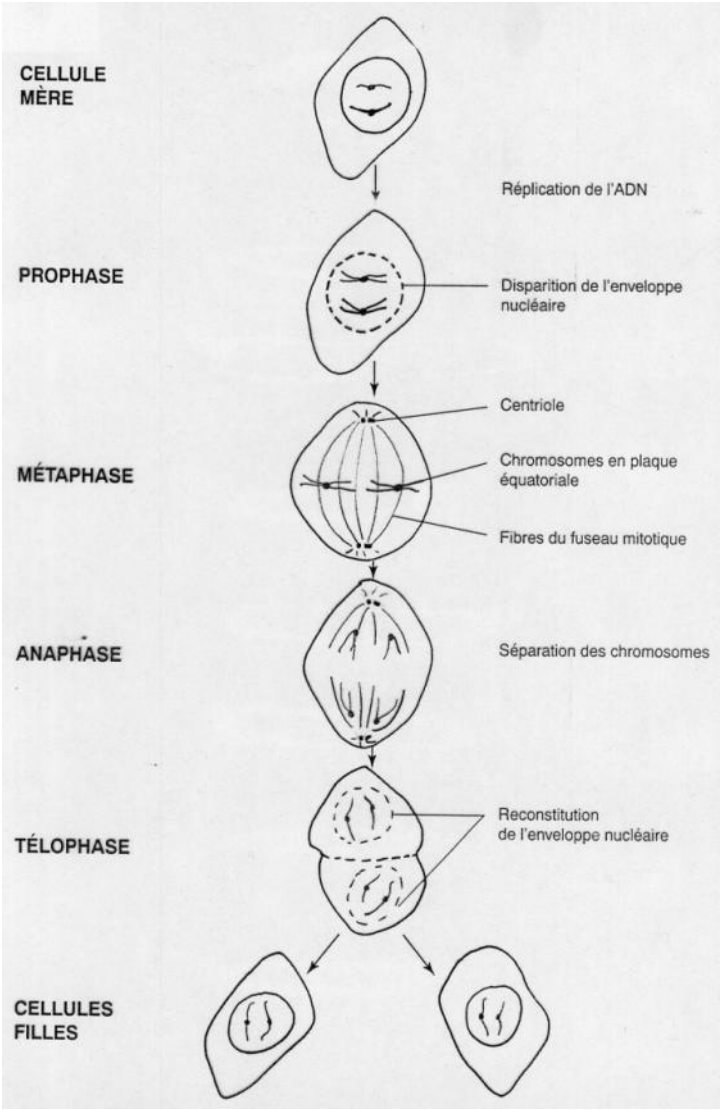
Hep-2000

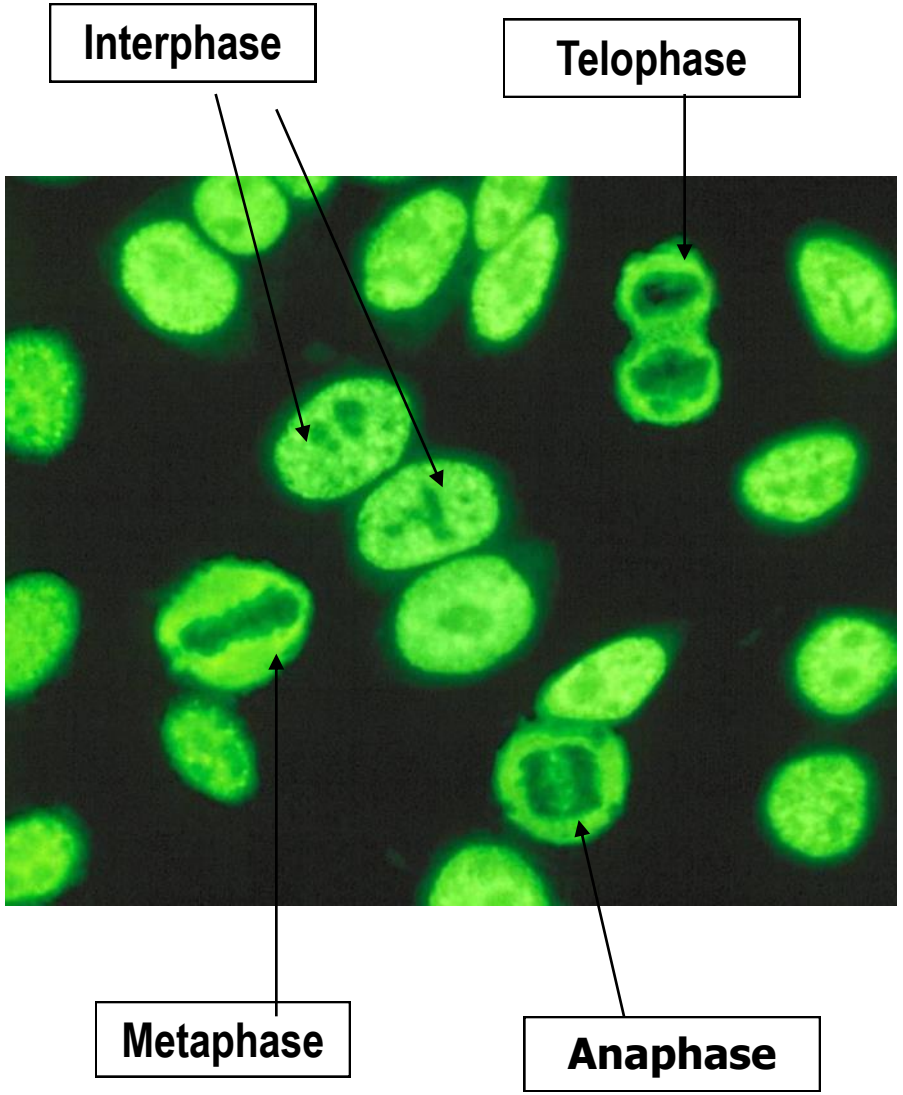
- Human Epithelioma pharynx n°2
- Surexprimant l'antigène Ro60

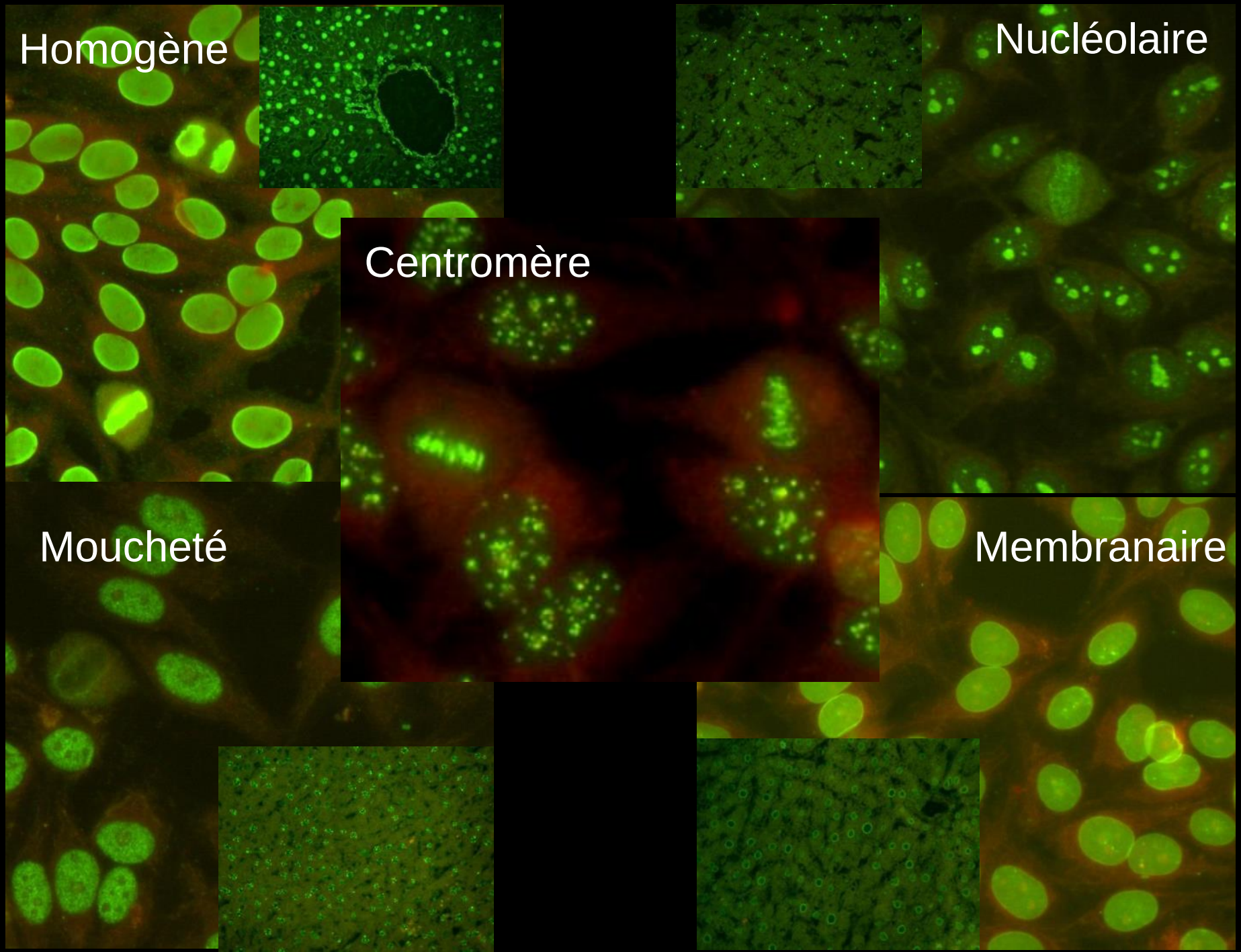
Dilution de dépistage 1/80

Titrage (1/160,1/320, 1/640, 1/1280)

Rappel du cycle cellulaire






Homogène
Nucléolaire
Centromère
Moucheté
Membranaire

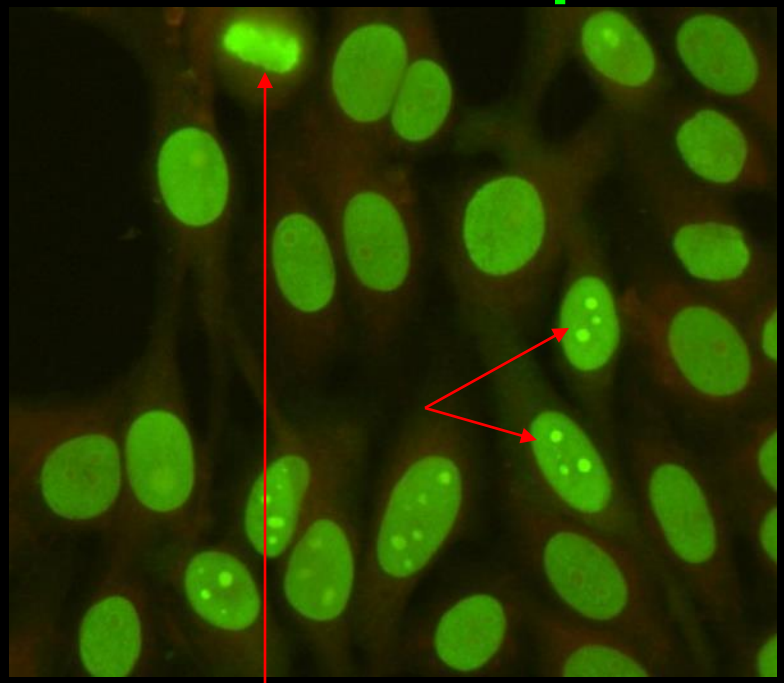
Ac du Sjogren

- Anticorps anti Ag nucléaires solubles
- SSA/Ro (Ro60 seul, Ro60+Ro52, Ro52 seul)
- SSB/La

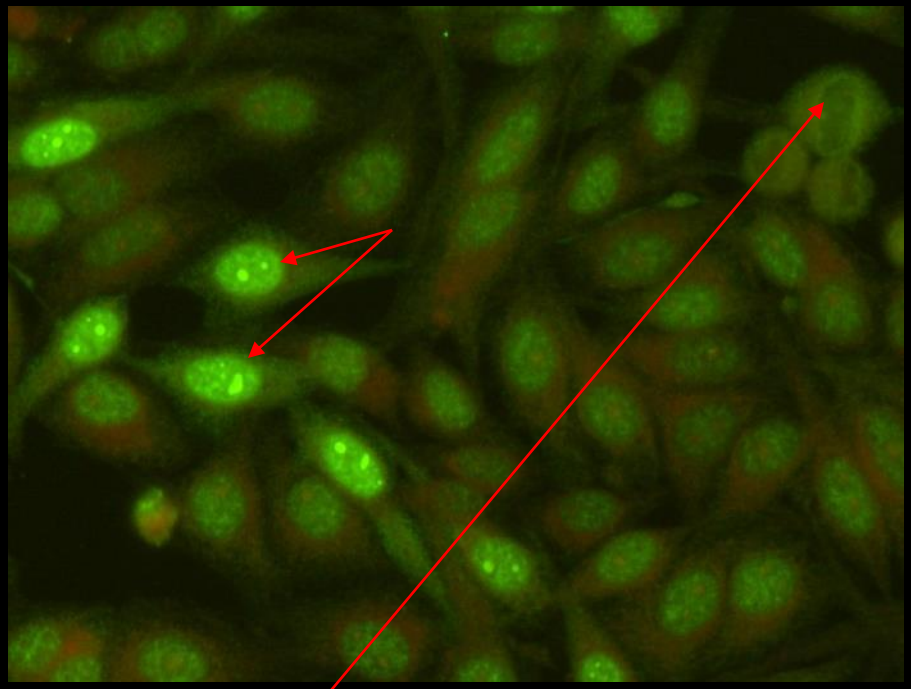
- NUMA 1 et 2
- GW/P images immunofluorescence

JL Charuel

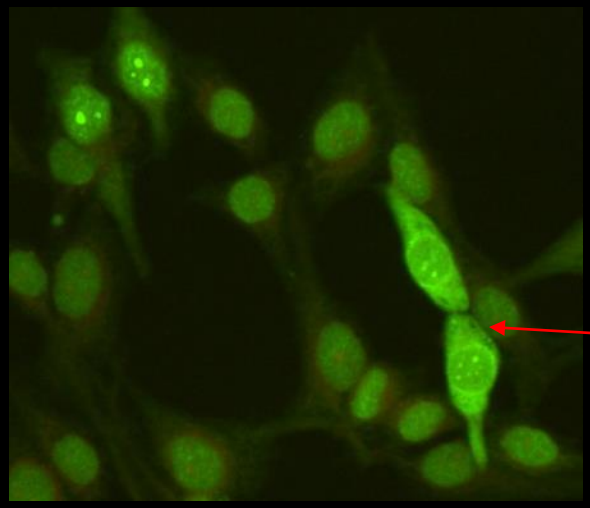
aspects « SSA »



Homogène SSA



Moucheté SSA

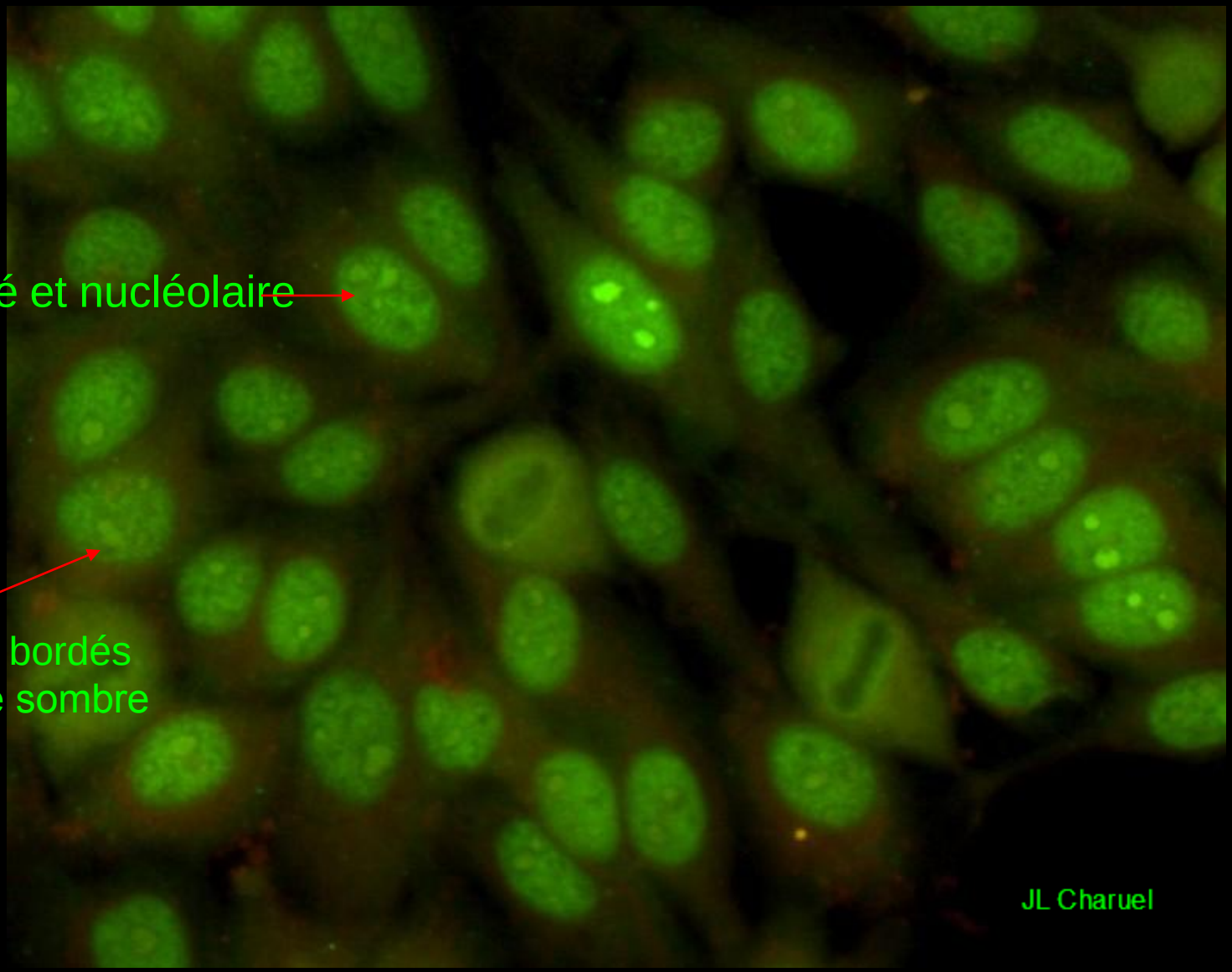


Cytoplasme
des cellules
transfectées

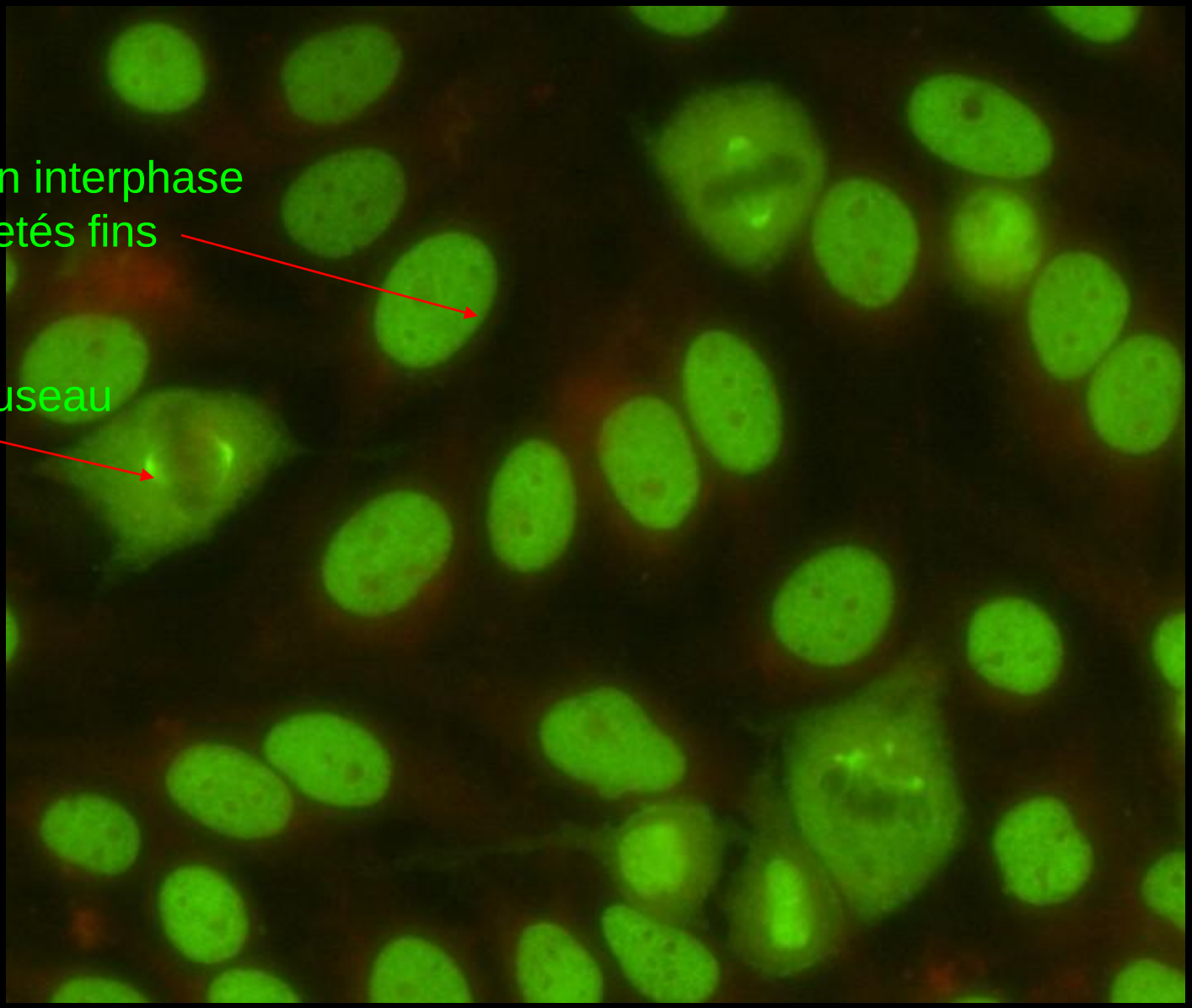
cytodiérèse

métaphase

Anti-SSA SSB


Moucheté et nucléolaire
Nucléoles bordés
d'un liseré sombre
JL Charuel

Anti-fuseaux (I) : NUMA-1



Cible : Centrophiline

Anti-fuseaux (II) : NUMA-2

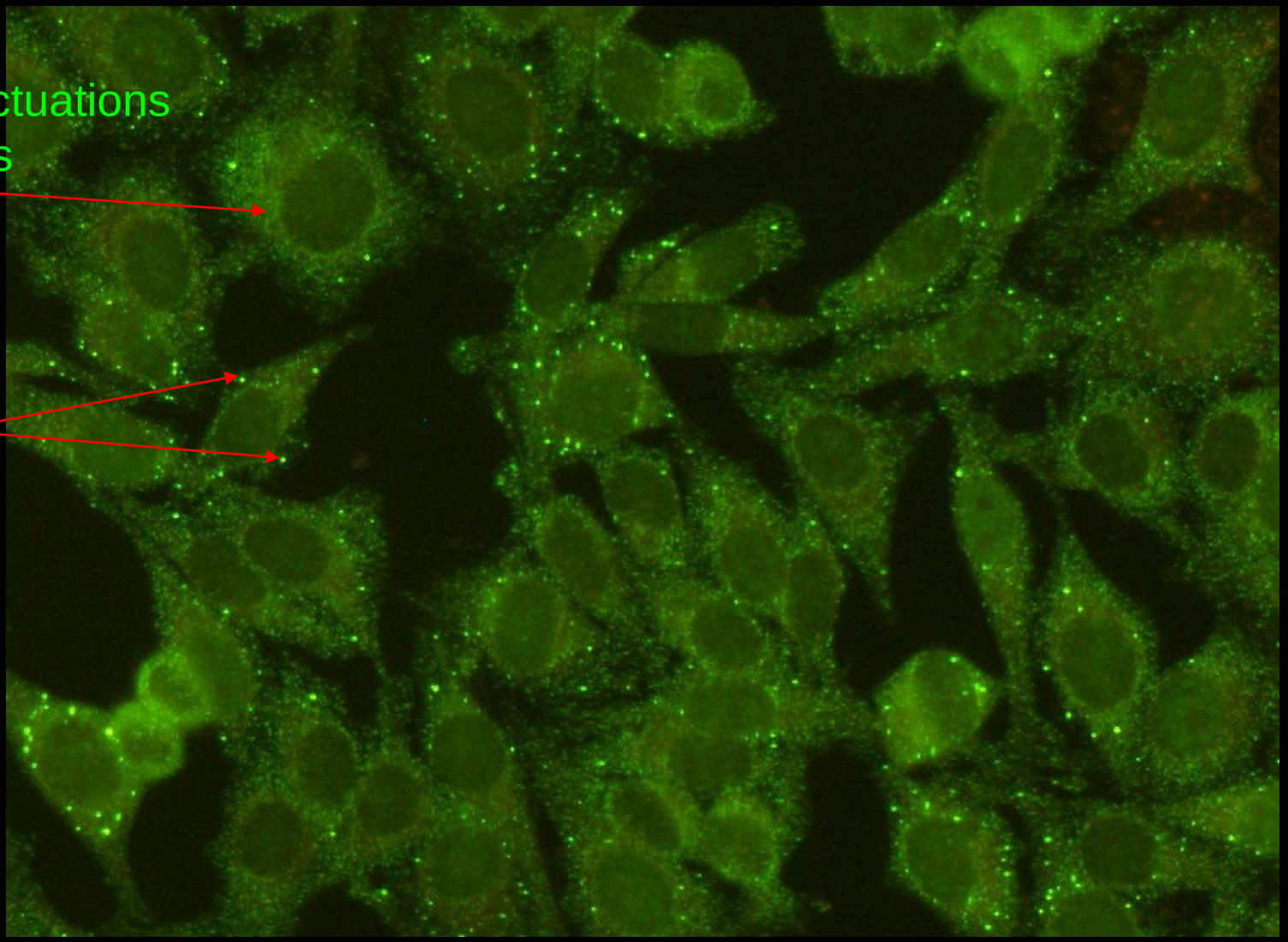
Cibles : kinésine HsEg5, Aurora kinase A

JL Charuel

Anti-GW(P)-bodies

« tapis » de ponctuations fines et serrées

« dots » cytoplasmiques



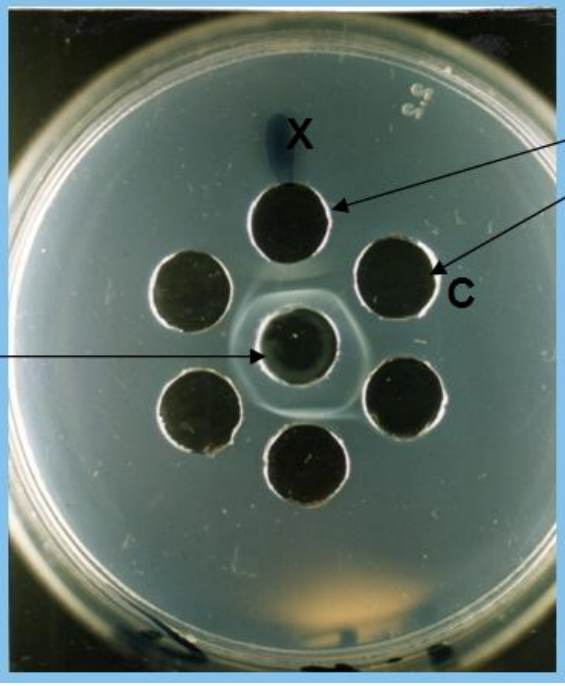
Cibles :
Protéines Su, Ago-2, …

JL Charuel

Ouchterlony : immunodiffusion double

Immunodiffusion sur gélose

Extrait antigénique (lysat)



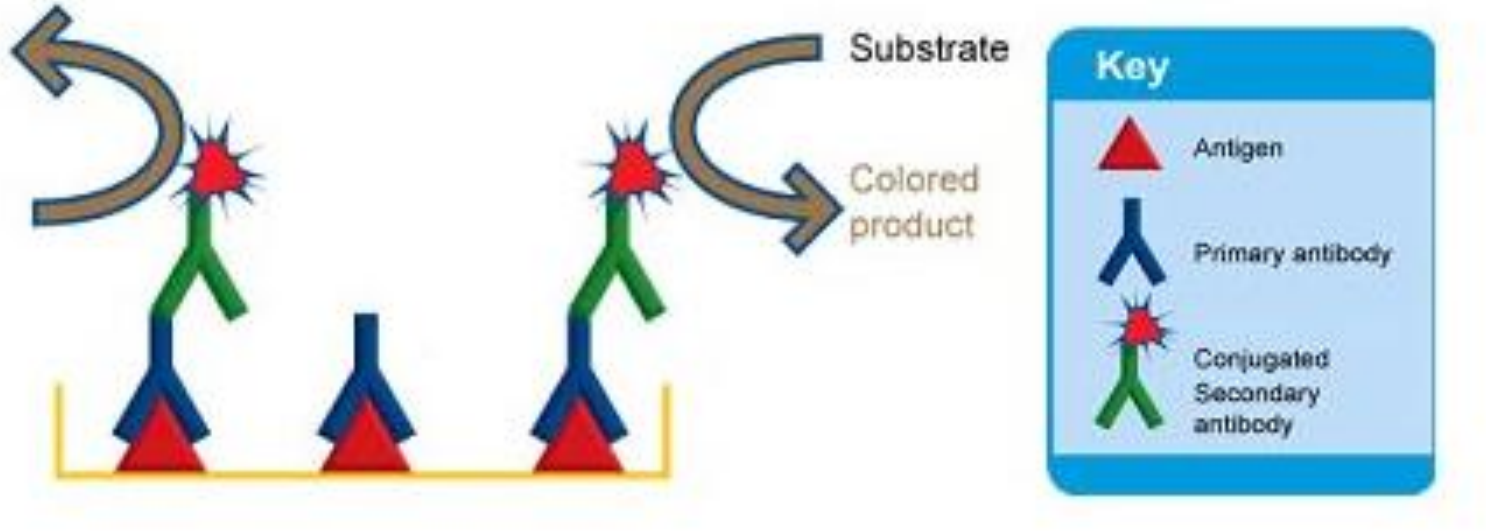
Sérums

X = ac à identifier

C = ac connu

Méthode historique, lente, lecture parfois délicate n'est plus utilisée

ELISA



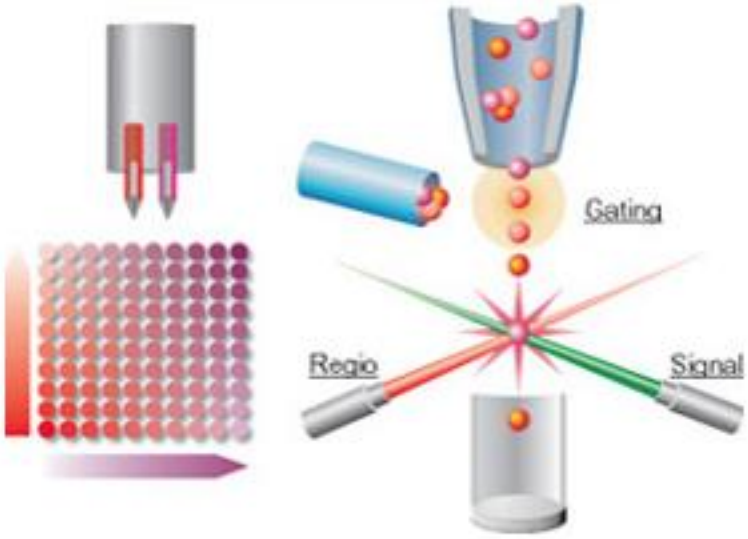
Techniques immunoenzymatiques :

- Ag purifiés ou le plus souvent recombinants (60 et/ou 52 kDa pour le SSA)

.

- Beaucoup plus sensibles leur problème est leur spécificité : définition d’un seuil de positivité, nombreux faux positifs.

LUMINEX



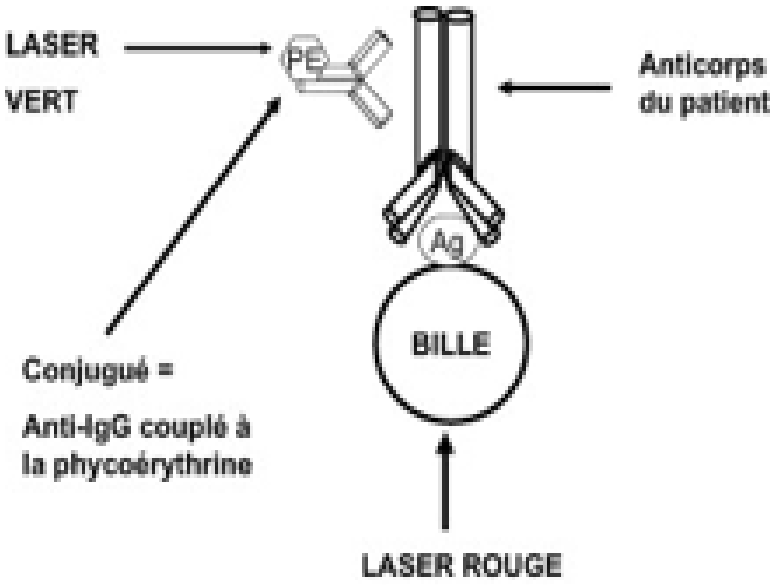
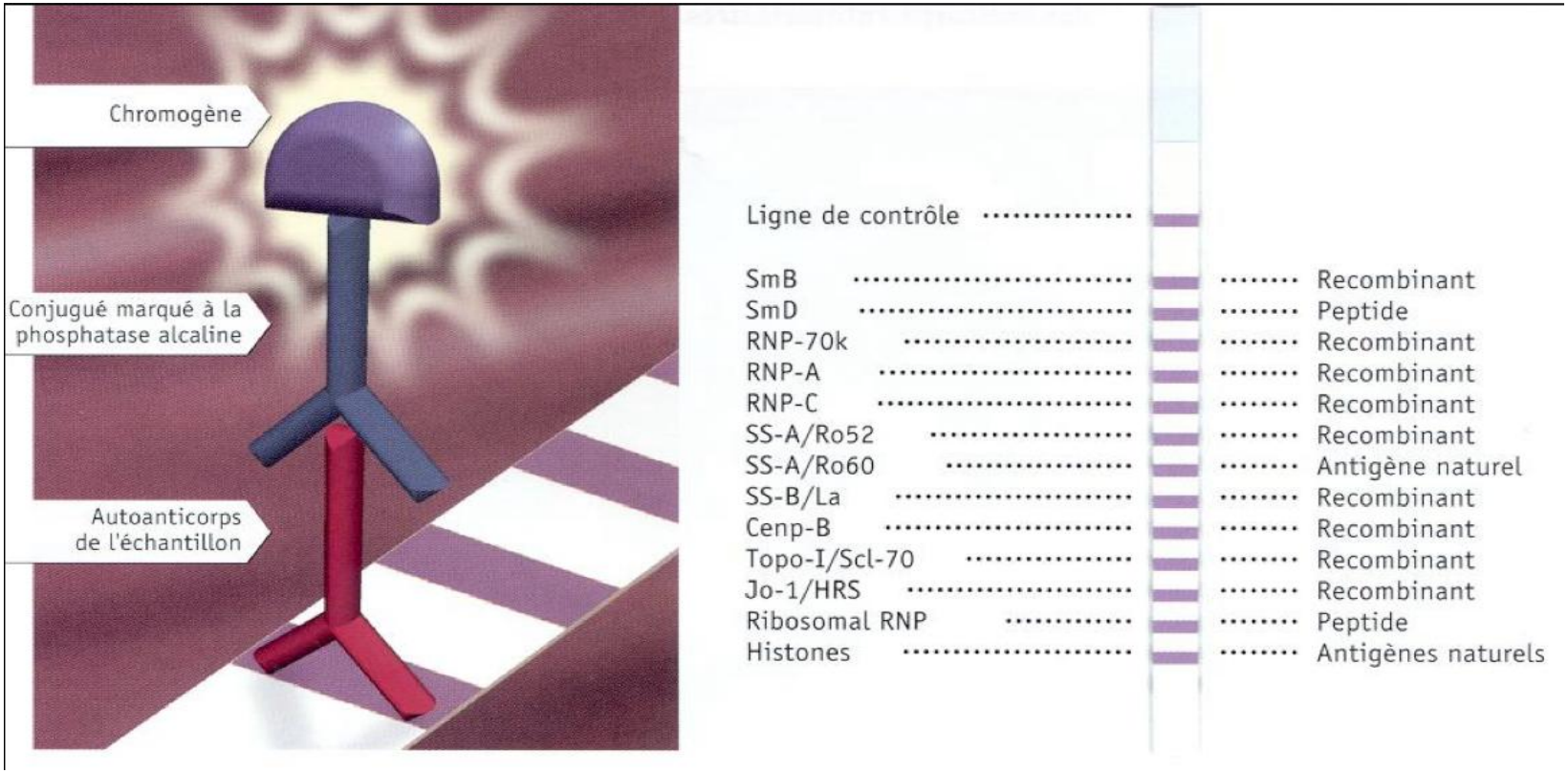


Fig. 5. Détection d'anticorps à l'aide de la technologie Luminex.

IMMUNODOTS

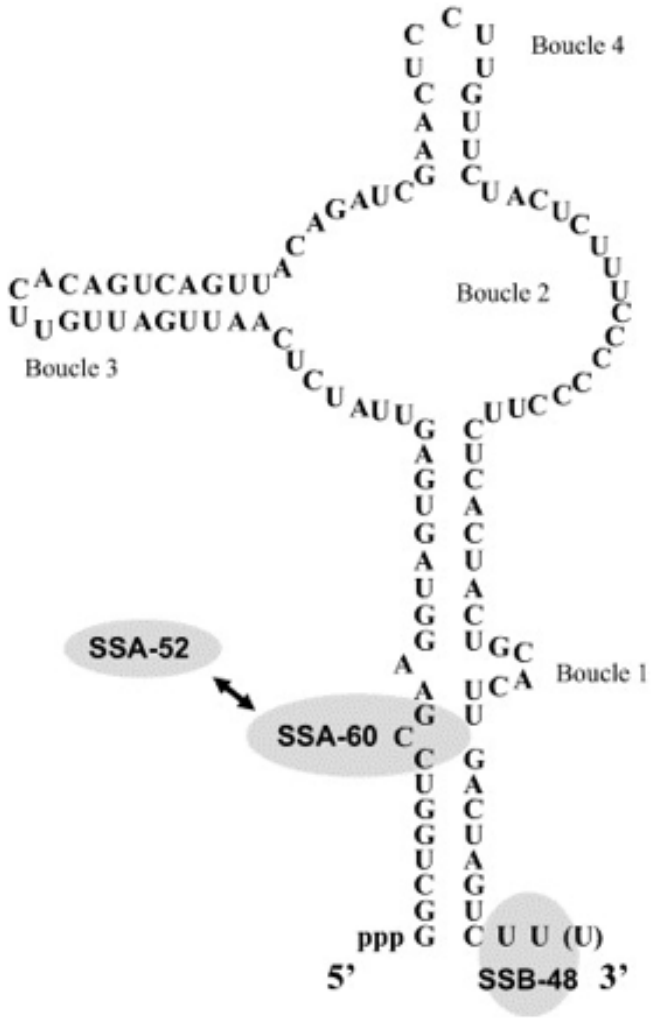


problème de la subjectivité de sa lecture.

Structure complexe Ro/La

- Complexe ribonucléoprotéique
- Partie ribonucléique :
  - l'un des quatre ARN cytoplasmique non codant produit par l'ARN polymérase III (hYRNA 1,3,4,5) ou autres petits ARNs

- Partie protéique : partie immunogène de la molécule
  - Deux composants polypeptidiques de 52 (Ro52) et 60 kDa (Ro60)
  - Ro60 : se fixe à l'ARN par liaison covalente
  - Ro52 : se fixe à l'ARN par l'intermédiaire d'une autre protéine (Ro60 ou la calréticuline)
  - La : protéine de 48 kDa se lie à la partie 3' de l'ARN



C. Defendenti et al. Autoimmun Rev 2010

Anti-Ro52 et PID

Autoimmun Rev. 2011 Jul;10(9):509-13. doi: 10.1016/j.autrev.2011.03.004. Epub 2011 Apr 5.

Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: results of a multicentric study.

Ghillani P, André C, Toly C, Rouquette AM, Bengoufa D, Nicaise P, Goulvestre C, Gleizes A, Dragon-Durey MA, Alyanakian MA, Chretien P, Chollet-Martin S,Musset L, Weill B, Johanet C.

Source

Laboratoire d'Immunochimie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France. pascale.ghillani-dalbin@psl.aphp.fr

ISRN Rheumatol. 2012;2012:415272. doi: 10.5402/2012/415272. Epub 2012 Mar 27.

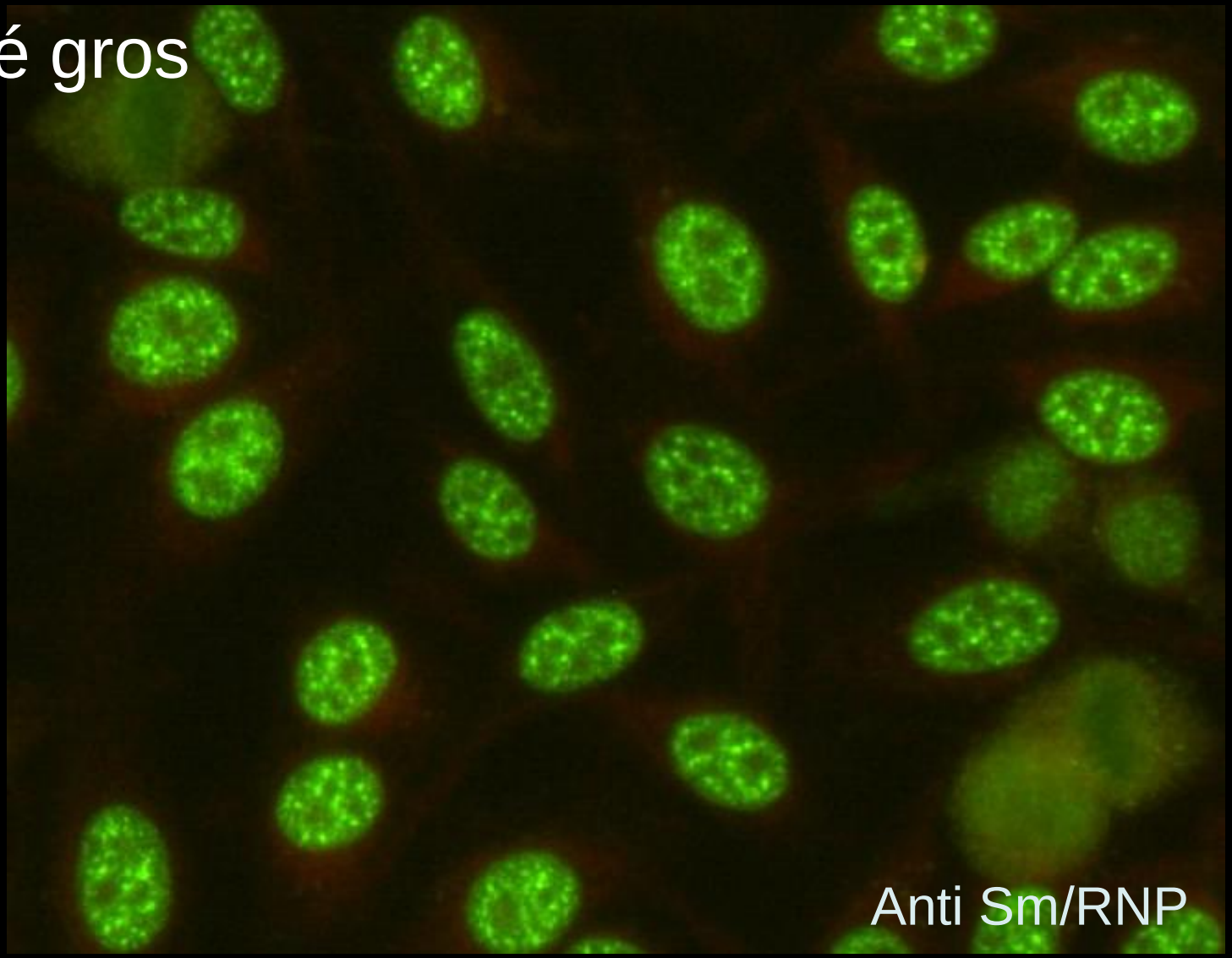
Anti-ro52 antibodies and interstitial lung disease in connective tissue diseases excluding scleroderma.

Ferreira JP, Almeida I, Marinho A, Cerveira C, Vasconcelos C.

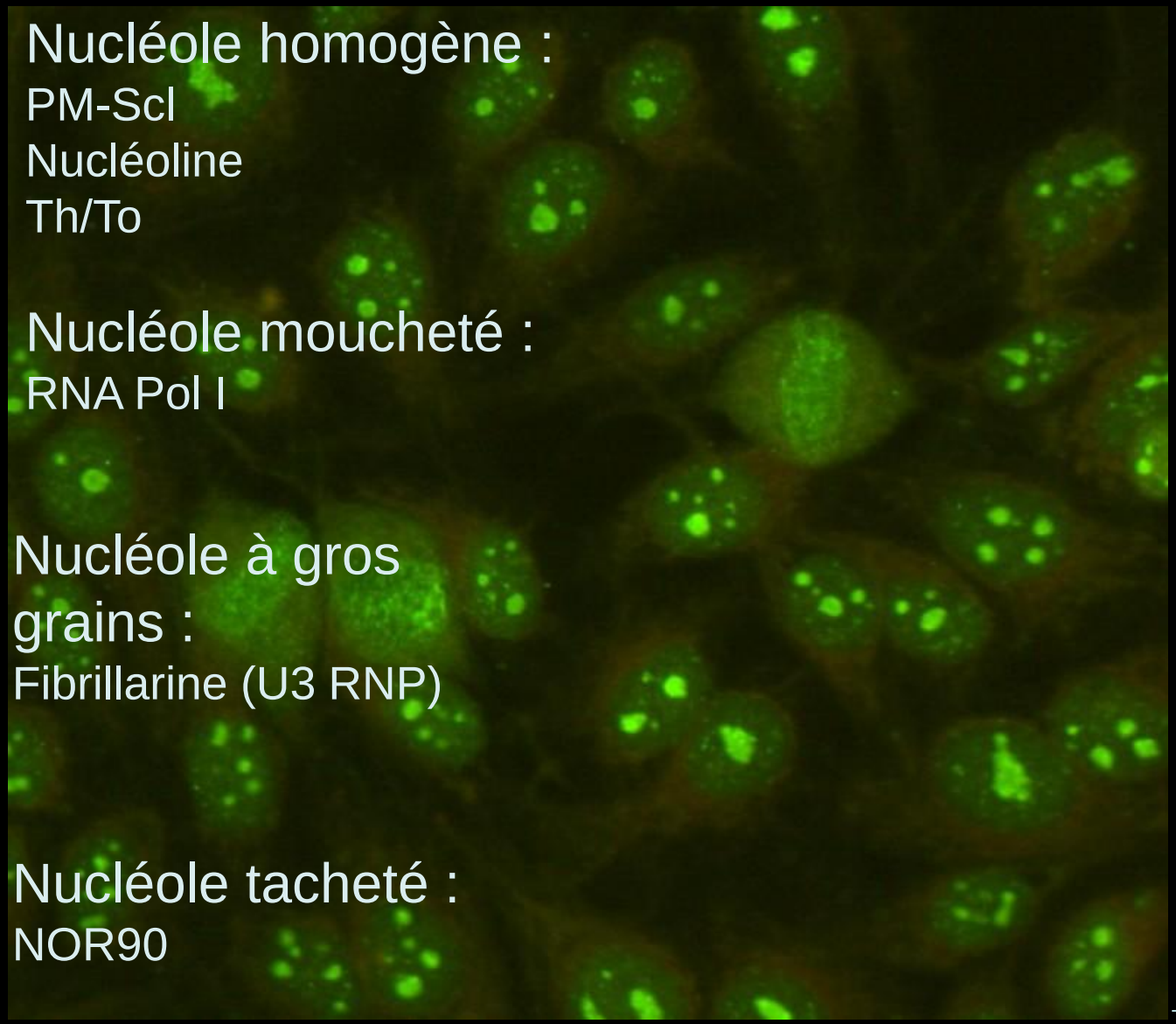
Aspect moucheté dot

Moucheté gros grains

-Sm
-U1RNP
….



Aspect nucléolaire



Nucléole homogène :
PM-Scl
Nucléoline
Th/To

Nucléole moucheté :
RNA Pol I

Nucléole à gros grains :
Fibrillarine (U3 RNP)

Nucléole tacheté :
NOR90

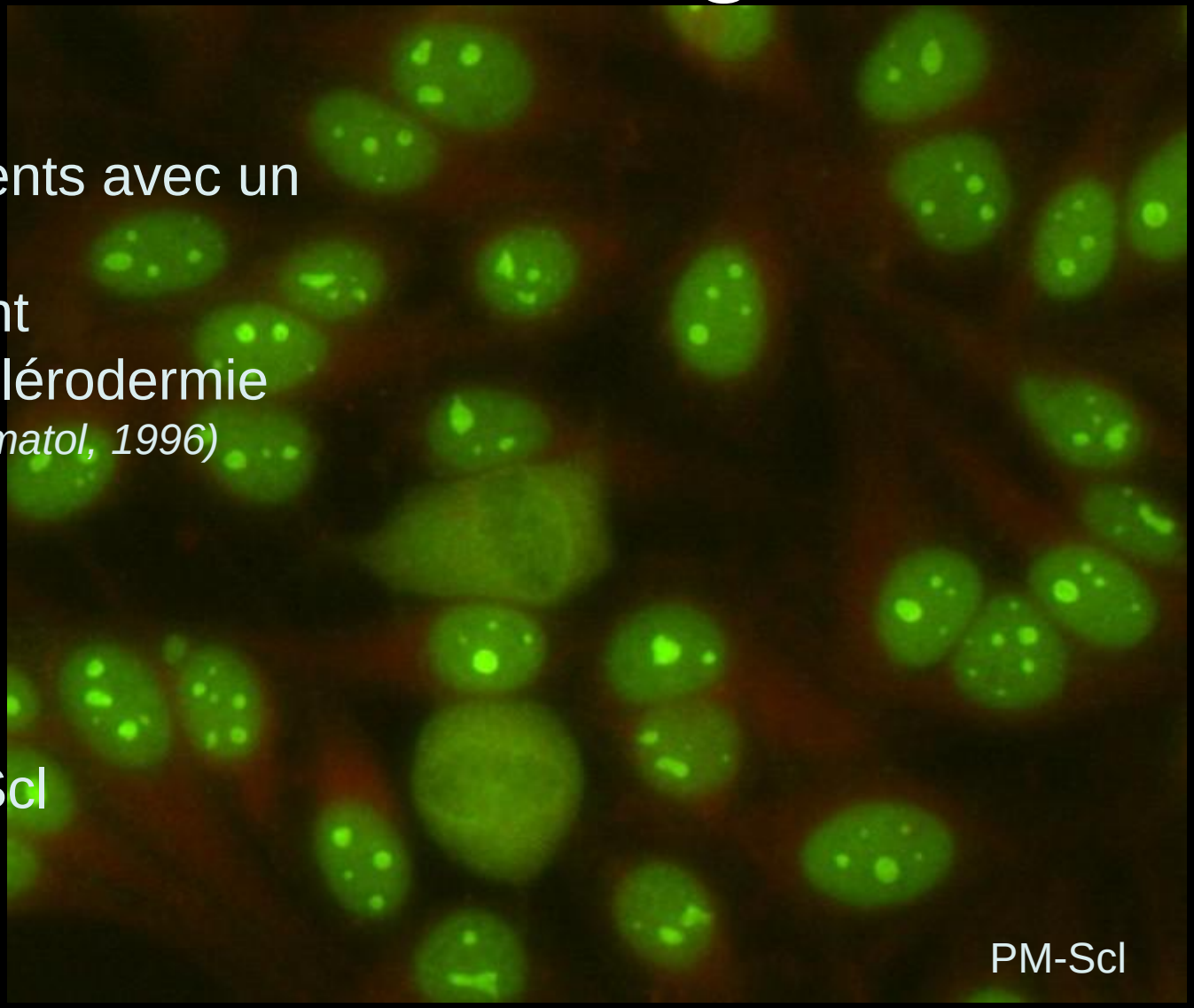
Présents chez 15-40% des patients sclérodermiques

(Bernstein, *Clin Exp Immunol 1982)*

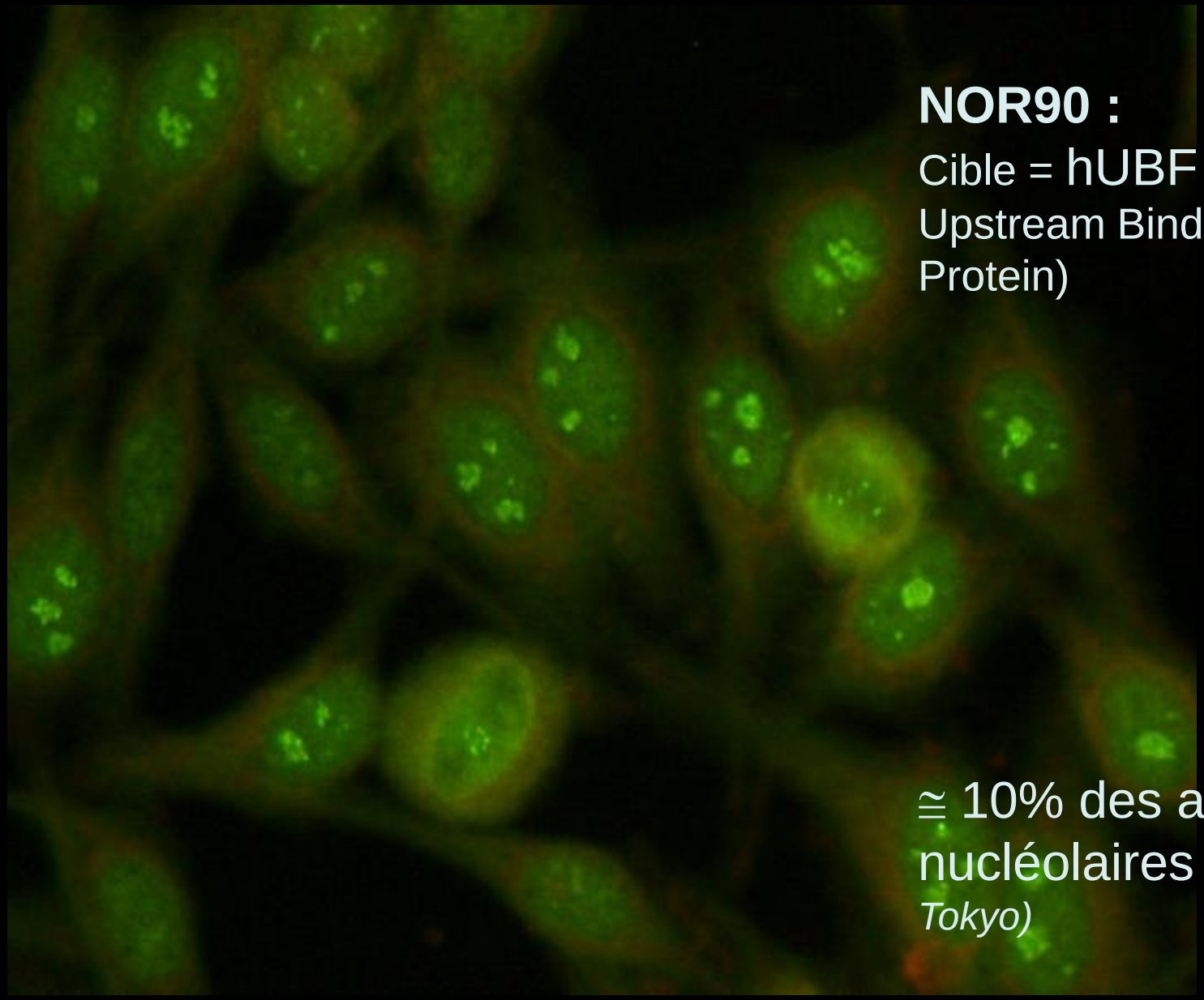
Nucléole Homogène

50 % des Patients avec un syndrome de chevauchement polymyosite/sclérodermie
(Hietarinta, *J Rheumatol, 1996)*

55% anti PM-Scl



Nucléole Tacheté



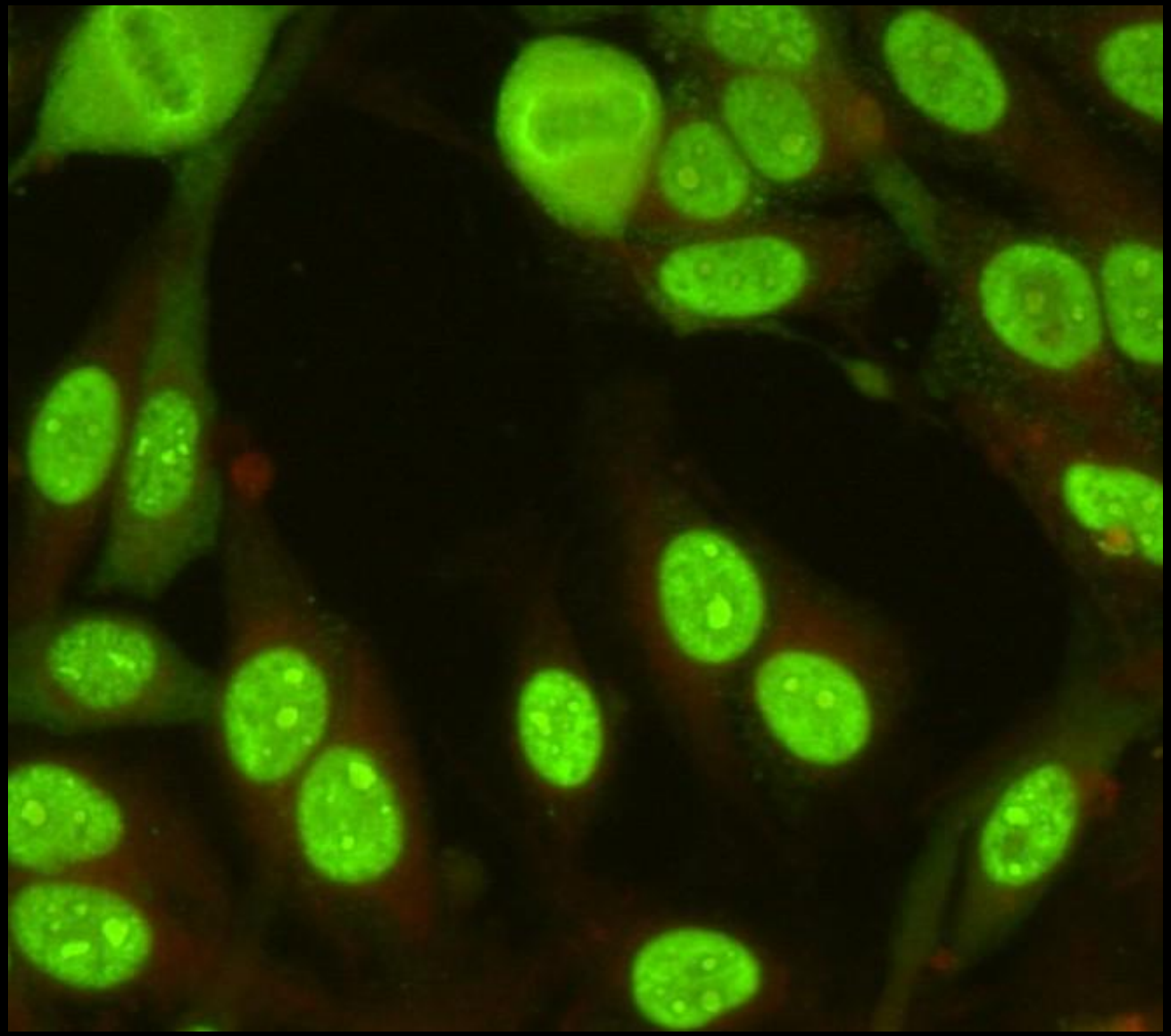
NOR90 :

Cible = hUBF (human Upstream Binding Protein)

≅ 10% des anti nucléolaires (Fujii, *Tokyo)*

Ku :
159 patients

33% : connectivite mixte
28% : LES,
4% : DM/PM
14% : SS
20% : autres MAI



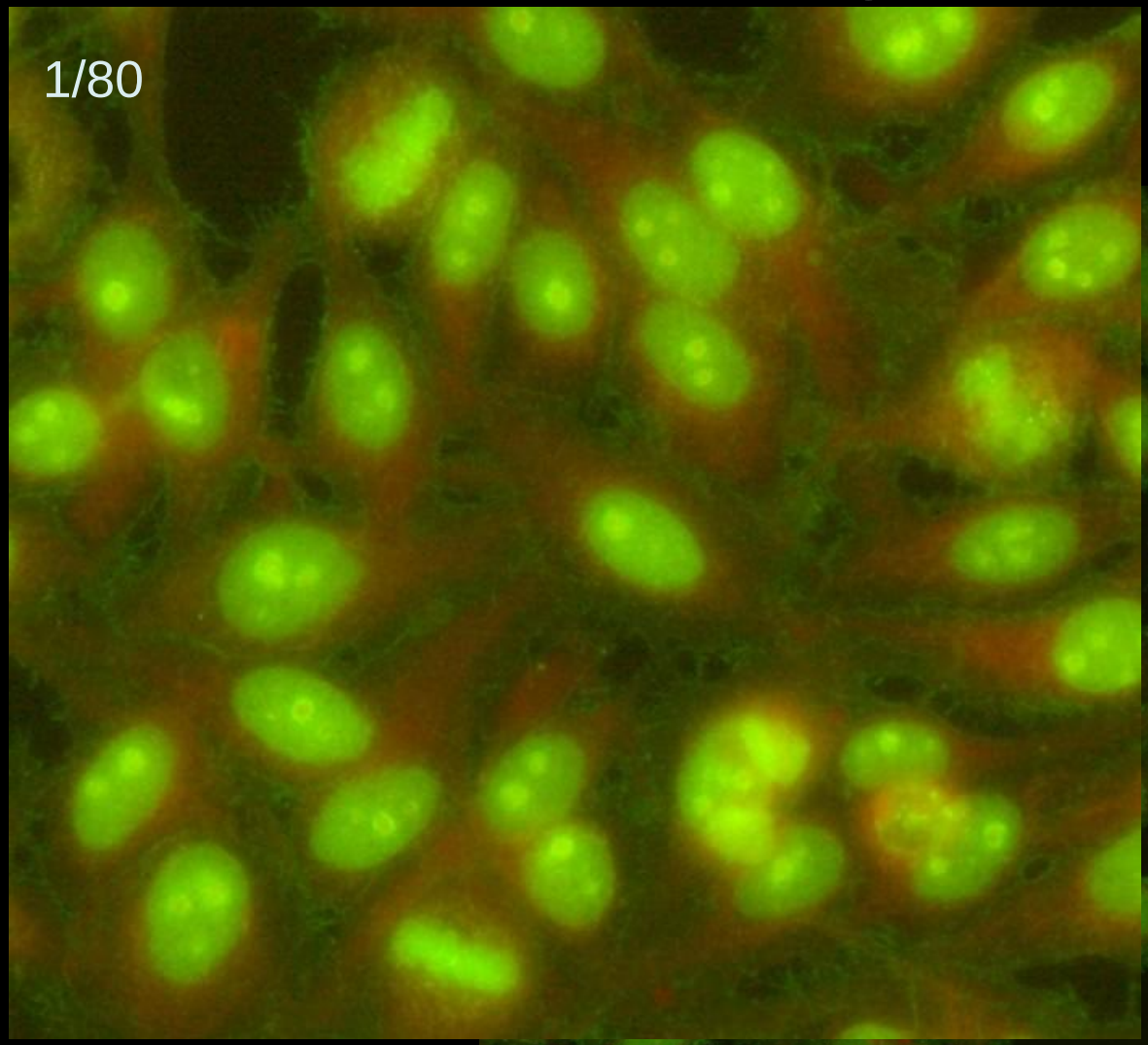
(Franceschini, *J Rheumatol, 2002)*

Anti-PM-Scl

50 % des Patients avec un syndrome de chevauchement polymyosite/ sclérodermie

(Hietarinta, *J Rheumatol, 1996)*

Aspect Homogène-nucléolaire



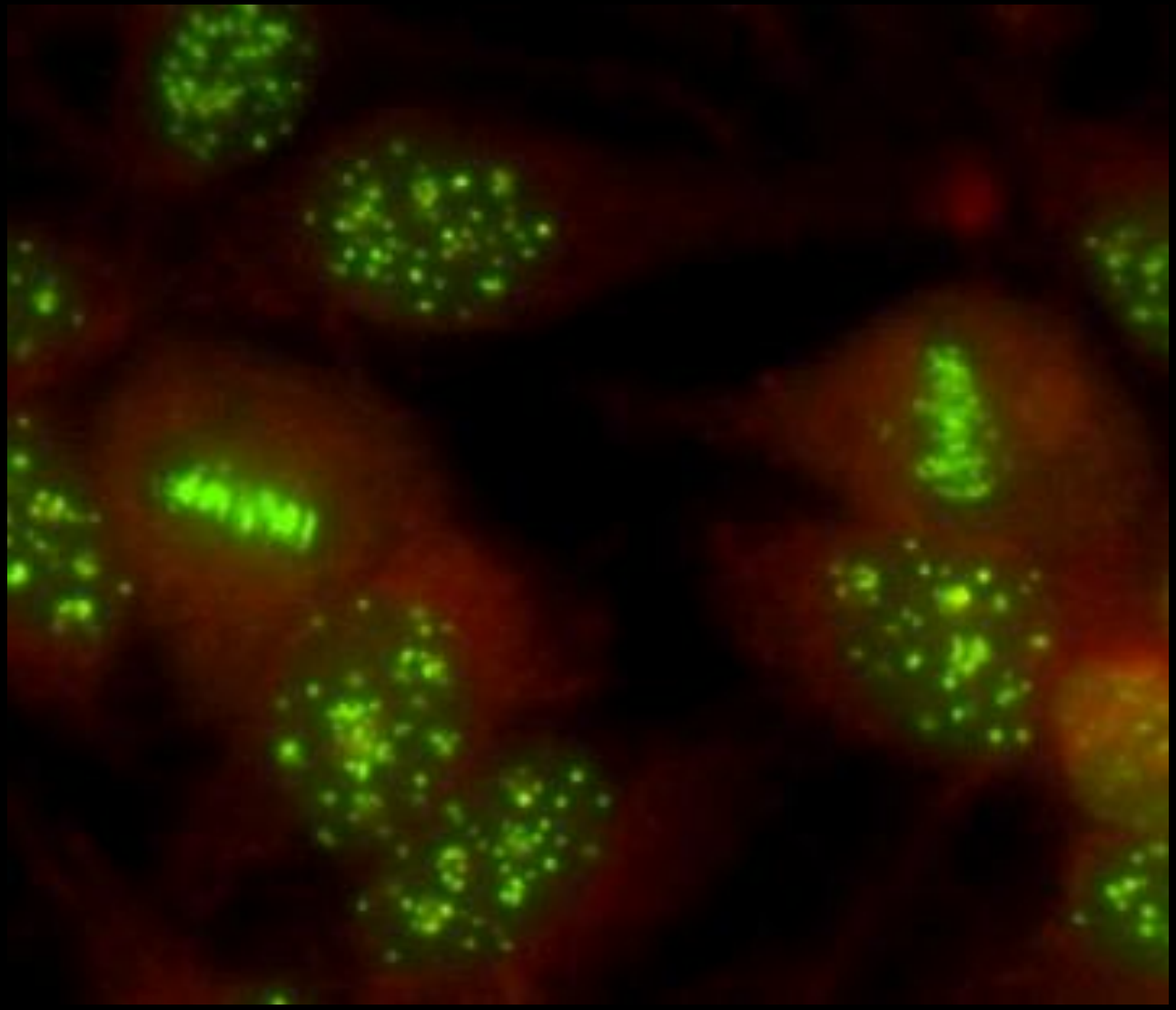
Anti-Scl70 :
Topoisomérase I

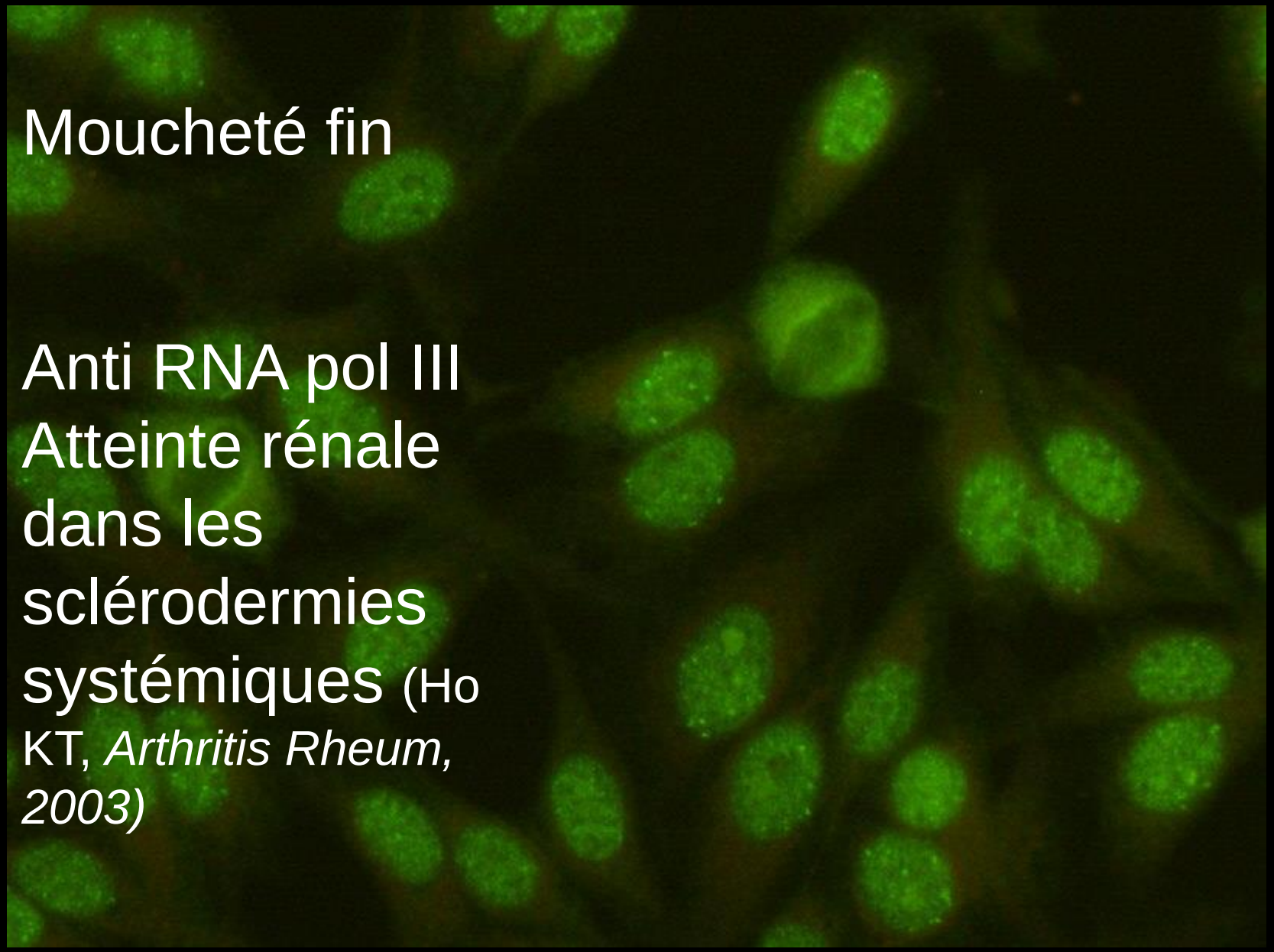
40% SSc diffuses
< 10% SSc limitées

(Spencer-Green, *Am J Med, 1997)*

dilution

Centromère

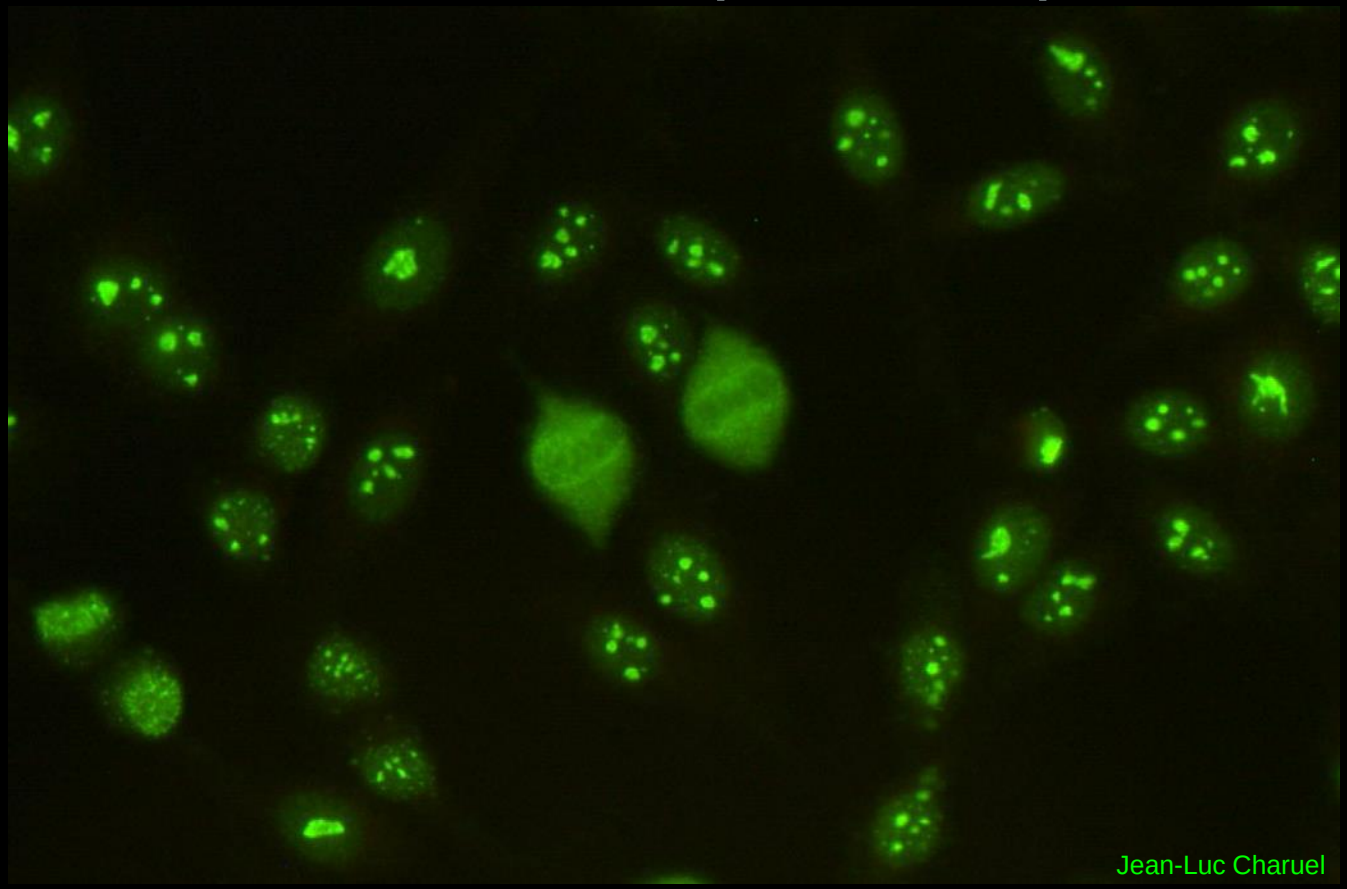



Moucheté fin
Anti RNA pol III
Atteinte rénale dans les sclérodermies systémiques (Ho KT, *Arthritis Rheum, 2003)*

Quid des sclérodermies séronégatives?

Anti-fibrillarine (U3 RNP)

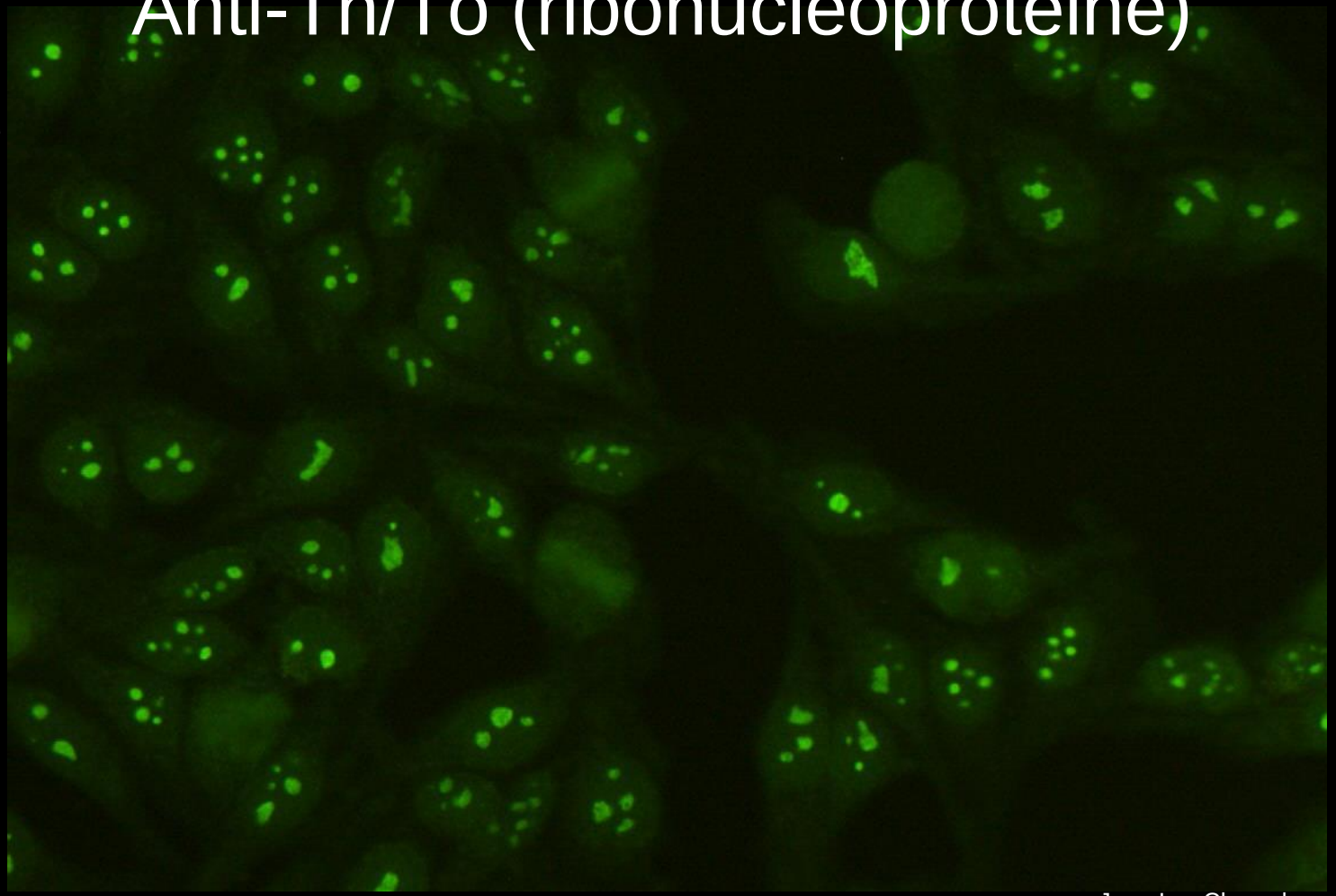
Marquage nucléolaire granulaire
+ mitoses positives



Quid des sclérodermies séronégatives?

Anti-Th/To (ribonucleoproteine)

Marquage nucléolaire
Homogène/granulaire



Jean-Luc Charuel

Laboratoire d'immunochimie Dr L Musset

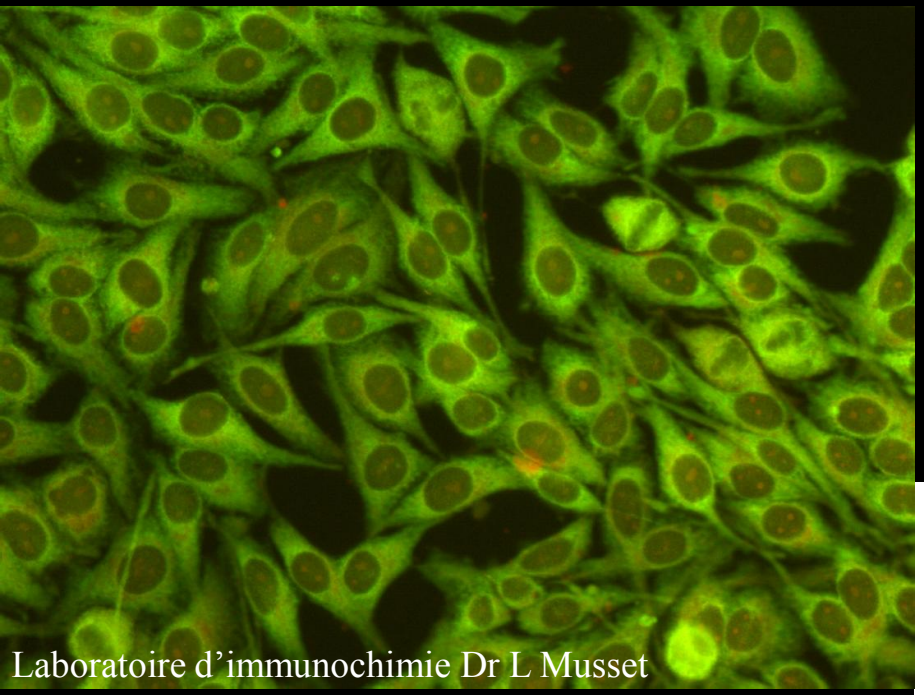
Anticorps associés aux myosites

- Les classiques
- Les « nouveaux » autoanticorps

Autoanticorps anti-SRP

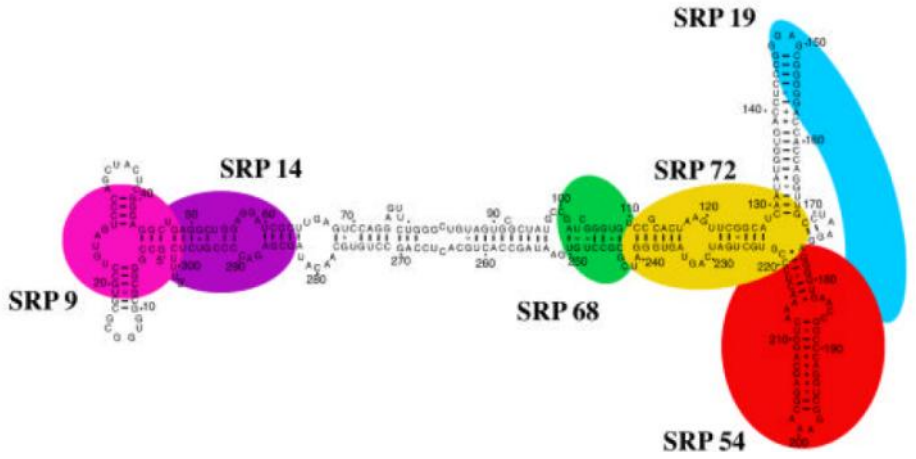
Dans 4 à 6% des myosites

Reeves WH, 1986

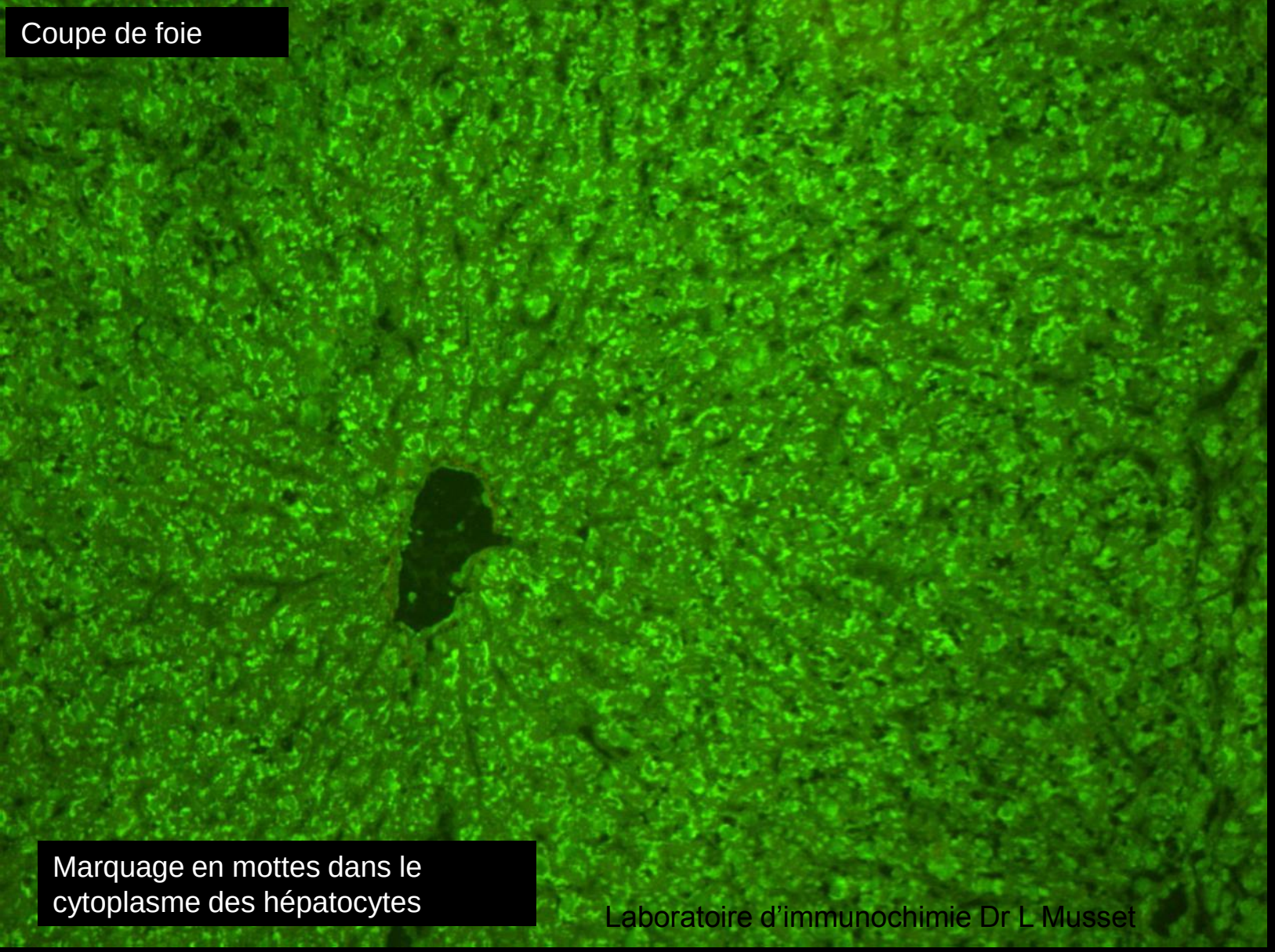


Immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2

Complexe protéique SRP (signals recognition particles) régule translocation et permet passage des protéines synthétisées par le ribosome vers le RER durant la synthèse protéique

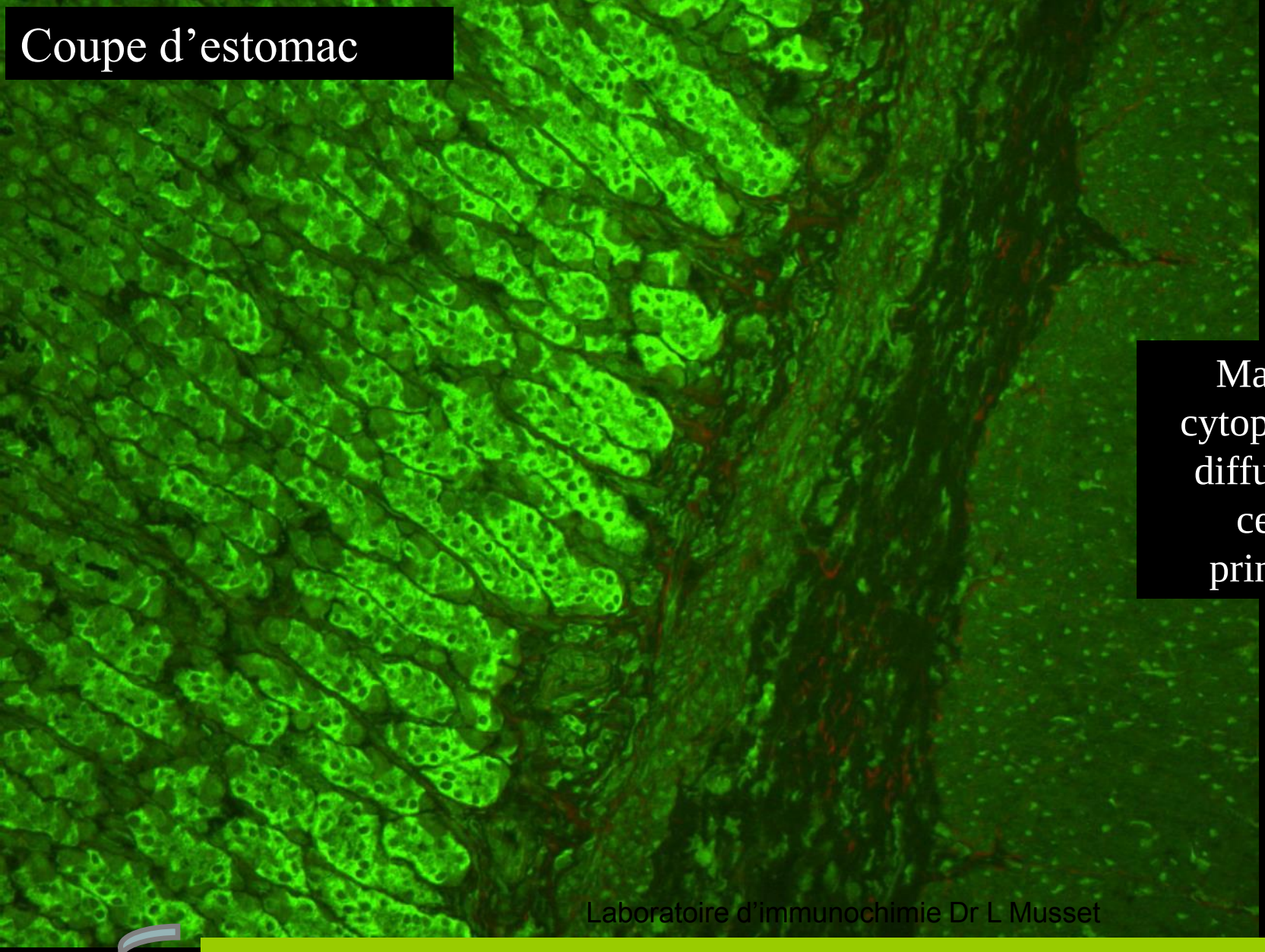


Miller T, Al-Lozi MT, Lopate G, Pestronk A. Myopathy with antibodies to the signal recognition particle: clinical and pathological features. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2002;73:420–8.



Immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes de rat

Coupe d'estomac



Marquage cytoplasmique diffus sur les cellules principales

Laboratoire d'immunochimie Dr L Musset

Aspect évocateur de la présence d'un Ac anti-SRP ou ribosome

Immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes de rat

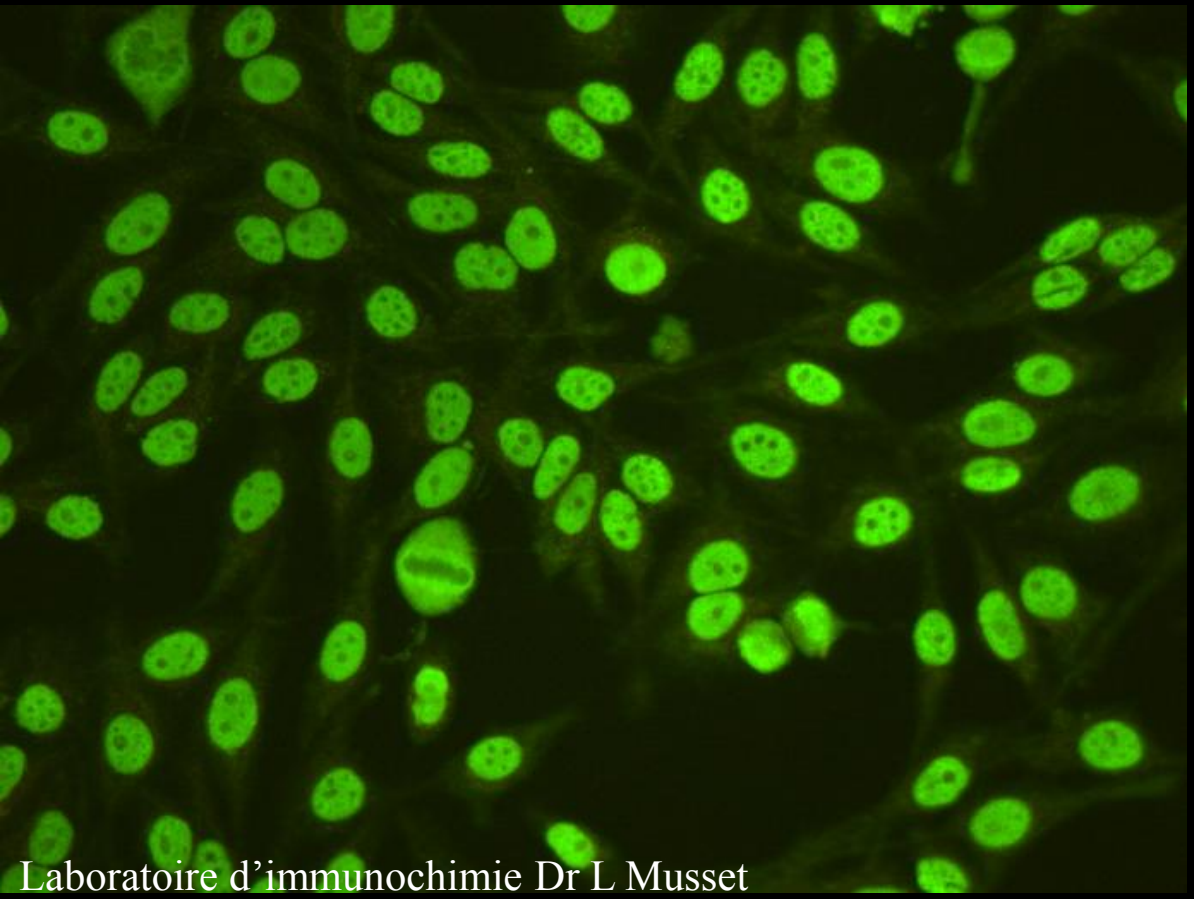
Autoanticorps anti-Mi2

Dans 4-18% des DM

Targoff et al, 1985

Spécifique des DM:

Spe: 98-100%



Laboratoire d'immunochimie Dr L Musset

Cible antigénique =

antigène nucléaire: complexe NuRD (nucleosome remodeling-deacetylase) :

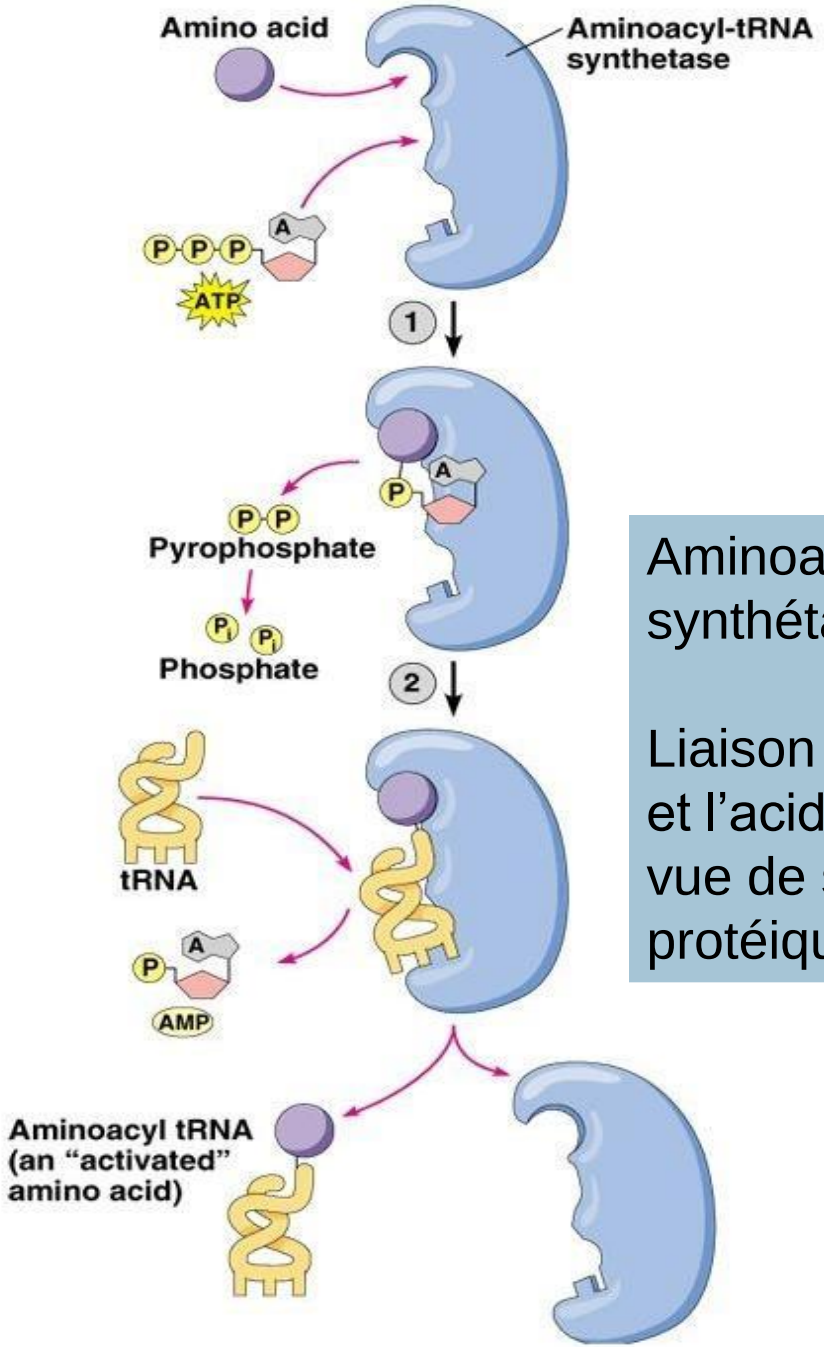
participe à la régulation de la transcription

Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, et al. Anti-Mi-2 antibodies. Autoimmunity 2005;38:79–83.

Auto-anticorps anti-aminoacyl-ARNt-synthétase

autoAc « spécifique » le plus souvent rencontré

Retrouvé dans le syndrome des antisynthétases

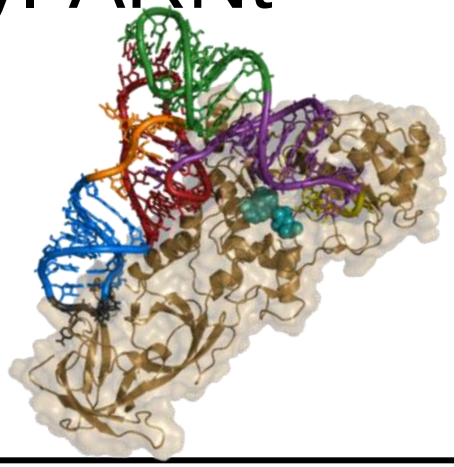


Aminoacyl-ARNt-synthétase :

Liaison entre ARNt et l'acide aminé en vue de synthèse protéique

Mathews MB, Bernstein RM. Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. Nature 1983;304:177–9.

Autoanticorps anti-aminoacyl-ARNt-synthétase

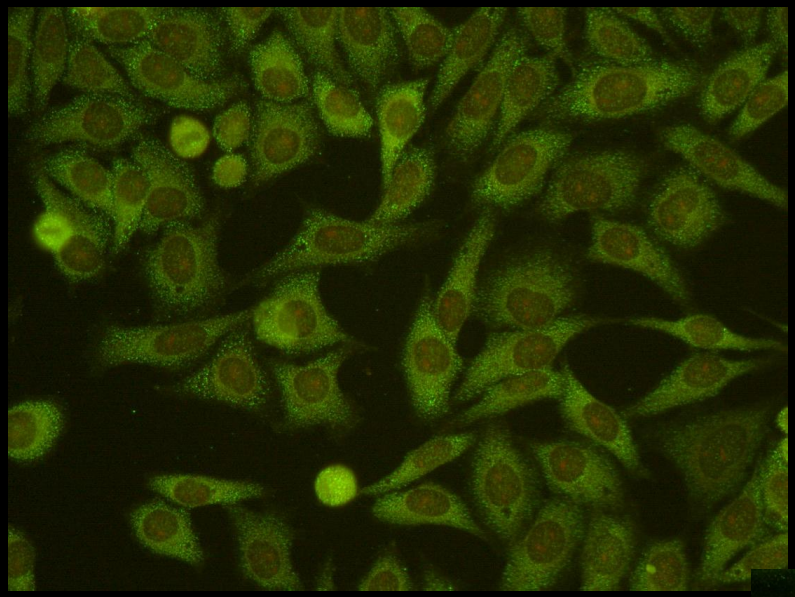


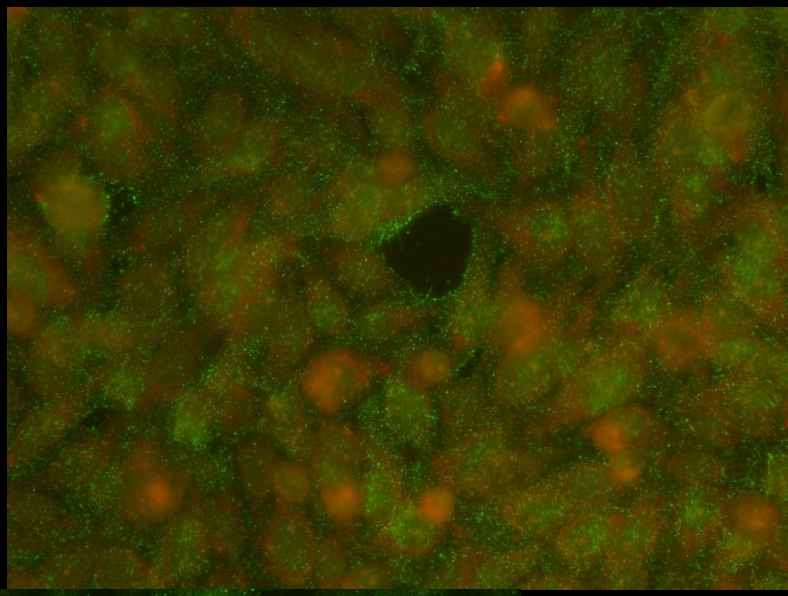
8 autoAc /20 potentiels mis en évidence

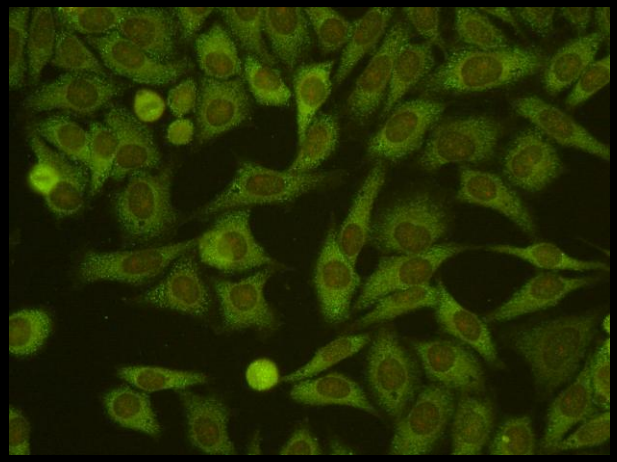
Auto-anticorps	Acide aminé	% de myopathie inflammatoire idiopathique	Nishikai M, 1980 Arthritis Rheum
Anti-Jo1	histidine	20%	Nishikai M, 1980 Arthritis Rheum
Anti-PL7	thréonine	< 15%	Mathews MB, 1984 J Exp Med
Anti-PL12	alanine		Bunn CC, 1986 J Exp Med
Anti-EJ	glycine		Targoff IN, 1992 Arthritis Rheum
Anti-OJ	isoleucine		Targoff IN, 1993 J Clin Invest
Anti-KS	asparagine		Hirakata, 1999 J Immunol
Anti-Ha	tyrosine		Hashish L, 2005 Arthritis Rheum
Anti-Zo	phénylalanine		Betteridge Z, 2007 Rheumatology

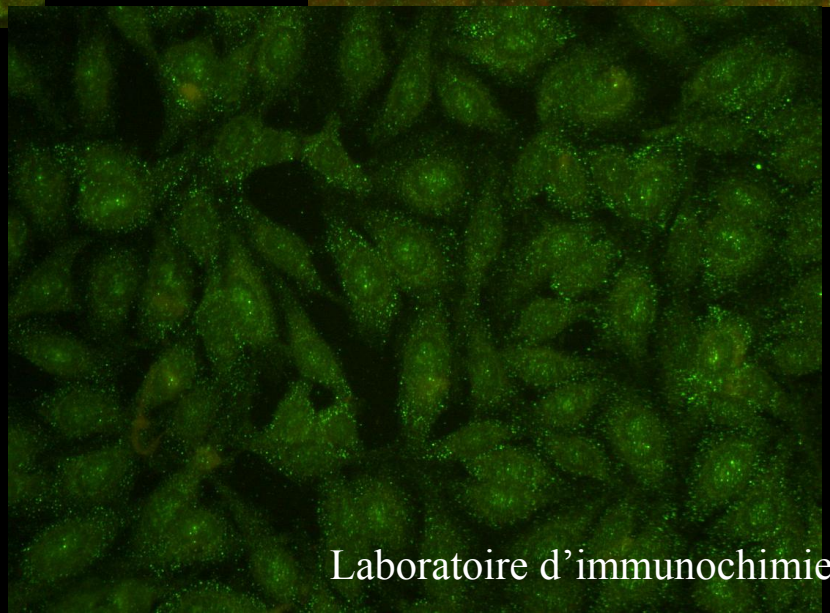
D'après Gunawardena H, Rheumatology 2009 *Review Myositis-specific autoantibodies: their clinical and pathogenic significance in disease expression*

Autoanticorps anti-histidyl-ARNt-synthétase : Jo1





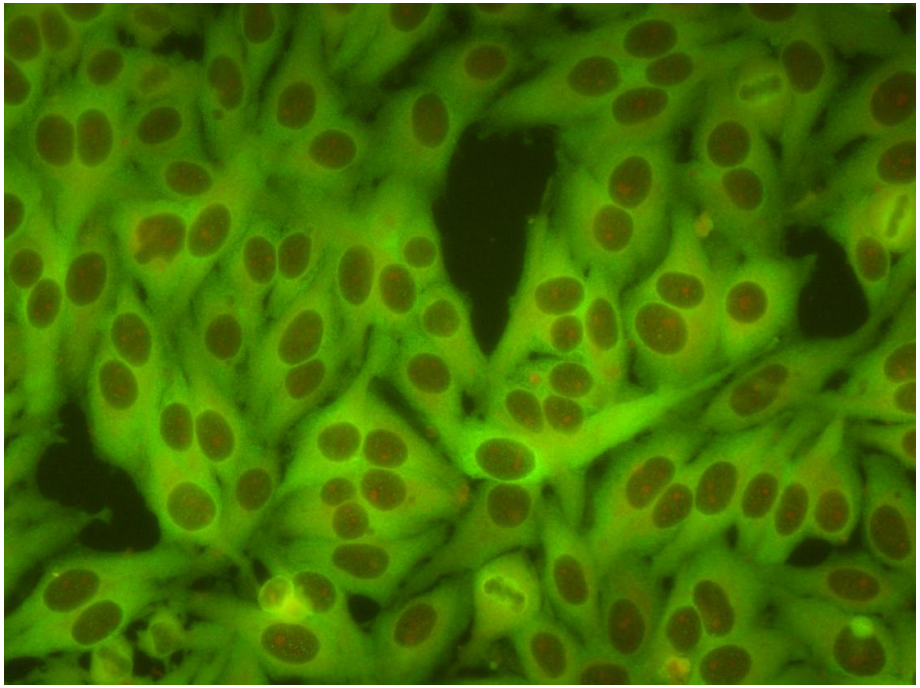




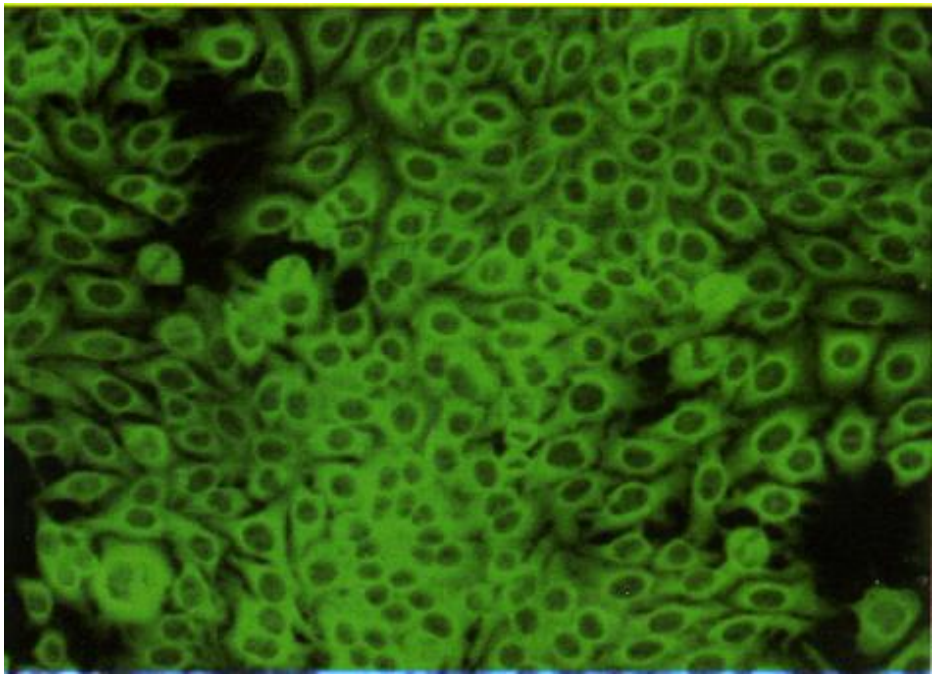
Laboratoire d'immunochimie Dr L Musset

Autoanticorps anti-aminoacyl-ARNt-synthétase

Anticorps anti-PL12



Anticorps anti-PL7

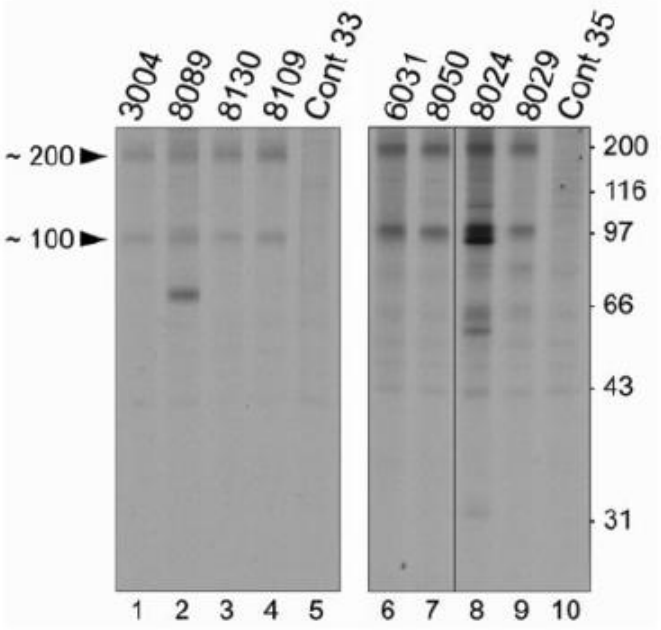


Laboratoire d'immunochimie Dr L Musset

Recherche de nouveaux Ac: Pourquoi? Comment?

Pourquoi ?

- 30-50% des myopathies sans Ac décelables
- Biopsie, clinique, histoire pas toujours contributifs ou cohérents entre eux….



Lisa Christopher-Stine, 2010 Arthritis and Rheum

Comment ?

Screen de sera de patients avec caractéristiques cliniques, biologiques, biopsiques, etc… sans Ac connu

⬇

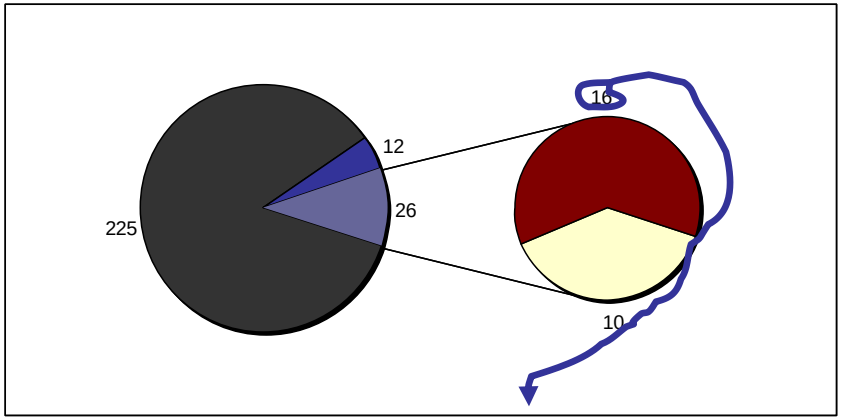
Le plus souvent: immunoprécipitations de lysats de cellules radiomarquées traitées avec sera de patients et visualisation des complexes Ag-Ac sur électrophorèse SDS-polyacrylamide

Anti-protéine 200/100 kDa dans myopathies nécrosantes

Sept 2010: Arthritis Rheum, Lisa Christopher-Stine et al. *A novel autoantibody recognizing 200-kd proteins is associated with an immune-mediated necrotizing myopathy*

225 patients atteints de myopathies, 38/225 (17%) avec myopathie nécrosante, 26/38 (10%) sans étiologie retrouvée

hypothèse: il existe chez ces patients un Ac impliqué non connu
-> Recherche par immunoprécipitation



16 (62%): Ac anti-protéine 200/100 kDa

- Ces patients ont à la biopsie: expression CMH1 sur fibres musculaires non nécrotiques
- Tous les patients ont bien répondu à thérapie immunosuppressive

en faveur mécanisme à médiation immunitaire

Anti-200/100 kDa dans MNMI et exposition au statines

- 10/12 (83%) patients > 50 ans avec aAc anti protéine 200/100 kd, avaient été exposés à des statines

⇐ fréquence statistiquement plus élevée que exposition à statine de patients d'âge similaire avec PM, DM et myosites à inclusions

Needham M, Fabian V, Knezevic W, Panegyres P, Zilko P, Mastaglia FL. Progressive myopathy with up-regulation of MHC-I associated with statin therapy. Neuromuscul Disord 2007;17: 194–200.
Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA, Srinivasan J, Katz J, Amato AA. Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. Muscle Nerve 2010;41:185–90.

- 33 patients développant myopathie autoimmune à la suite de exposition à statines, pas stoppé par arrêt de statine

Myopathie nécrosante médiée par le système immunitaire (MNMI) avec aAc anti protéine 200/100kd associée à la prise de statine ?

ARTHRITIS & RHEUMATISM
Vol. 63, No. 3, March 2011, pp 713–721
DOI 10.1002/art.30156
© 2011, American College of Rheumatology

Autoantibodies Against 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase in Patients With Statin-Associated Autoimmune Myopathy

Andrew L. Mammen, Tae Chung, Lisa Christopher-Stine, Paul Rosen, Antony Rosen, Kimberly R. Doering, and Livia A. Casciola-Rosen

1/ identification de aAg de 100 kd: HMGCoA reductase (HMGCR)

2/ statines up-régulent expression de HMGCR dans les myopathies nécrosantes médiées par le système immunitaire (MNMI)

3/ cellules musculaires régénérantes expriment fortement l'HMGCR -> d'où maintient de réponse immunitaire après arrêt des statines

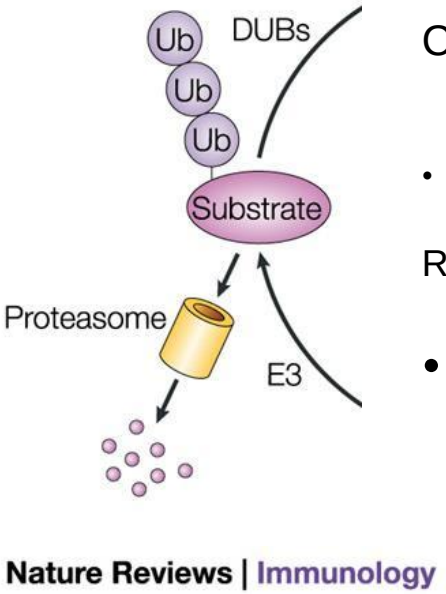
4/ 45/750 (6%) patients avec symptômes d'atteintes musculaires pris en charge au Johns Hopkins Myositis Center ont des aAc anti-HMGCR

Ces patients avec aAc ont un phénotype MNMI et > 90% de ceux de + de 50 ans ont été exposés aux statines

II Anti-SAE (small ubiquitin-like modifier activating enzyme)

- 2007, Arthitis Rheum Betteridge Z et al

Identification d'Ac chez 2/20 patients avec DM (90-40kDa)



Nature Reviews | Immunology

Cible de ces Ac: SAE = enzyme impliquée dans les modifications post-traductionnelles

- 2008, Ann Rheum Dis Betteridge Z et al

Recherche de ces Ac chez 266 patients cohorte AOMIC (adulte onset myositis immunogenetic collaboration UK) ayant myopathie inflammatoire idiopathique

- 33 patients développant myopathie autoimmune à la suite de exposition à statines, pas stoppé par arrêt de statine

➡ Ac anti-SAE retrouvés dans 8.4% des DM

Ac semblent apparaître chez des patients qui présente une DM sans atteinte musculaire clinique (CADM) et qui progresse vers une DM systémique dont dysphagie +++

Études à mener pour savoir si anti-SAE est marqueur pronostic des patients CADM qui évolueront vers une myosite systémique ...

III Anti-CADM-140 (clinically amyopathic DM)

Autoantibodies to a 140-kd polypeptide CADM-140, in japanese patients with clinically amyopathic DM

Shinji Sato,[1] Michito Hirakata,[1] Masataka Kuwana,[1] Akira Suwa,[1] Shinichi Inada,[2] Tsuneyo Mimori,[3] Takeji Nishikawa,[1] Chester V. Oddis,[4] and Yasuo Ikeda[1]

ARTHRITIS & RHEUMATISM
Vol. 52, No. 5, May 2005, pp 1571–1576

298 patients avec connectivite ou fibrose pulmonaire interstitiel

- 8 sera réagissent avec protéine 140kd
  -> 8/42 patients avec DM

Tous cliniquement amyopathiques

développent plus fréquemment pathologie interstitielle pulmonaire évoluant rapidement

III

Anti-CADM-140 (clinically amyopathic DM) = anti-MDA-5

(melanoma differentiation-associated gene 5)

RNA Helicase Encoded by Melanoma Differentiation–Associated Gene 5 Is a Major Autoantigen in Patients With Clinically Amyopathic Dermatomyositis

Association With Rapidly Progressive Interstitial Lung Disease

Shinji Sato,[1] Kana Hoshino,[1] Takashi Satoh,[1] Tomonobu Fujita,[1] Yutaka Kawakami,[1] Takashi Fujita,[2] and Masataka Kuwana[1]

ARTHRITIS & RHEUMATISM
Vol. 60, No. 7, July 2009, pp 2193–2200

- cible des Ac caractérisée = MDA-5 = code pour une hélicase à ARN

➢ protéine cytoplasmique impliquée dans la réponse immunitaire innée contre les infections virales à ARN

Suggère association DM/ infection virale en particulier le Coxsackie virus, cible préférentielle du MDA-5
Rupture de tolérance du soi quand interaction MAD-5/ARN viral ?

III anti-MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5)

- *2010, Rheumatology Hoshino K etal. Anti-MDA5 et anti-TIFI-γ antibodies have clinical significance for patients with DM*

135 patients japonais avec des connectivites dont 82 avec DM

Clinical group	Age, years	Mean (s.d.)	Gender, male : female	Total, *n*	Anti-MDA5 antibodies, *n* (%)
DM	3–84	50 (19)	24 : 58	82	21 (26)
CADM	3–84	48 (20)	7 : 24	31	20 (65)**
Cancer-associated DM	48–80	66 (11)	5 : 7	12	0 (0)
Classical DM without cancer	16–76	47 (17)	12 : 27	39	1 (3)

26% des DM ont Ac anti-MDA-5

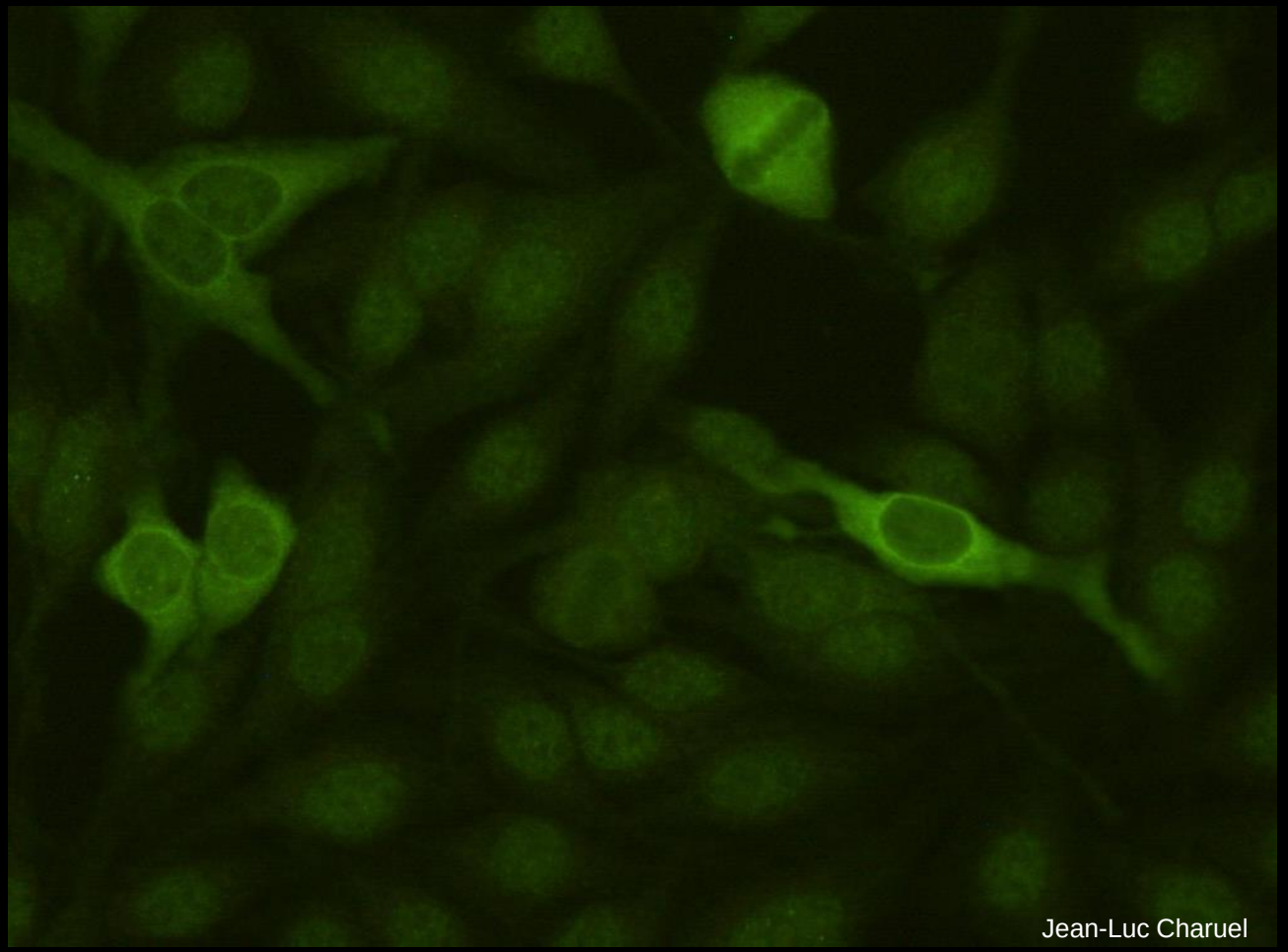
65 % des DM sans atteinte musculaire clinique ont cet Ac

95% (vs 31%) de pathologie pulmonaire interstitielle associée

Anti-MDA5 (CADM-140)

Cytoplasme diffus, avec renforcement périnucléaire, restreint à certaines cellules de l'étalement.

(aspect associé, sous réserve de validation avec un antigène spécifique)



Laboratoire d'immunochimie Dr L Musset

Dépistage

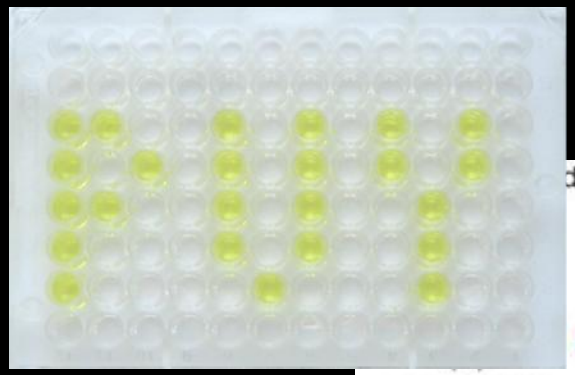
IFI : aspect, titre

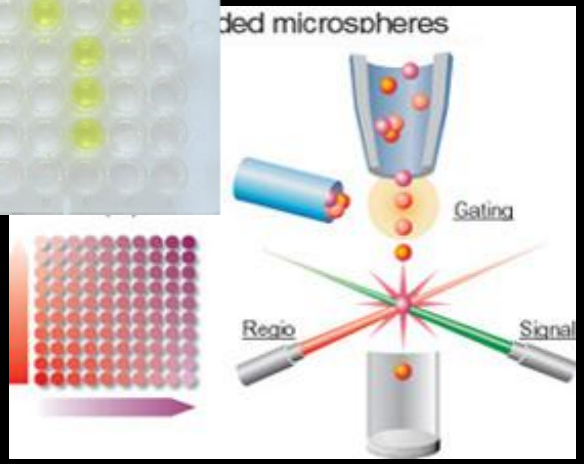
Identification : technique ELISA (ADN,ECT)

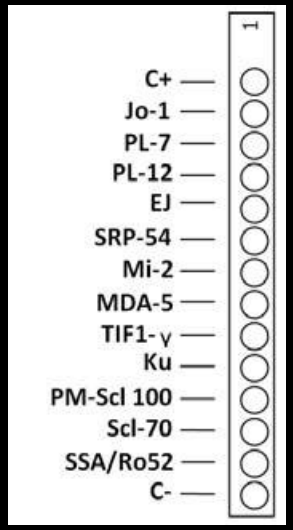
Identification : technologie Luminex® (ECT)

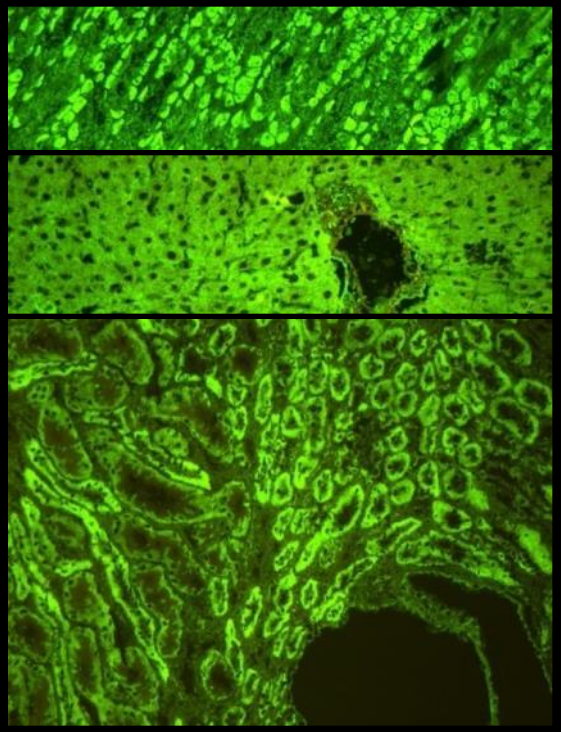
Identification : Immunodots

Identification : IFI sur coupe de tissus



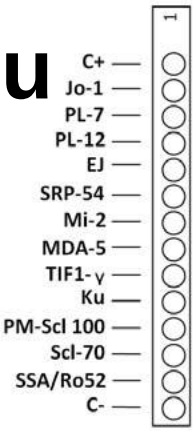






Take home message

- Examen clé = immunofluorescence indirecte sur cellules Hep-2
- Connectivite/myosites: Rarement négatifs
  - Fluorescence mouchetée: sjogren/Sharp
  - Fluorescence nucléolaire: sclérodermies
  - Fluorescence cytoplasmique: Myosites
- **Si urgence, le résultat peut-être obtenu en quelques heures (immunodots)**



Bonus:
Que faire devant des anticorps positifs sans la clinique?

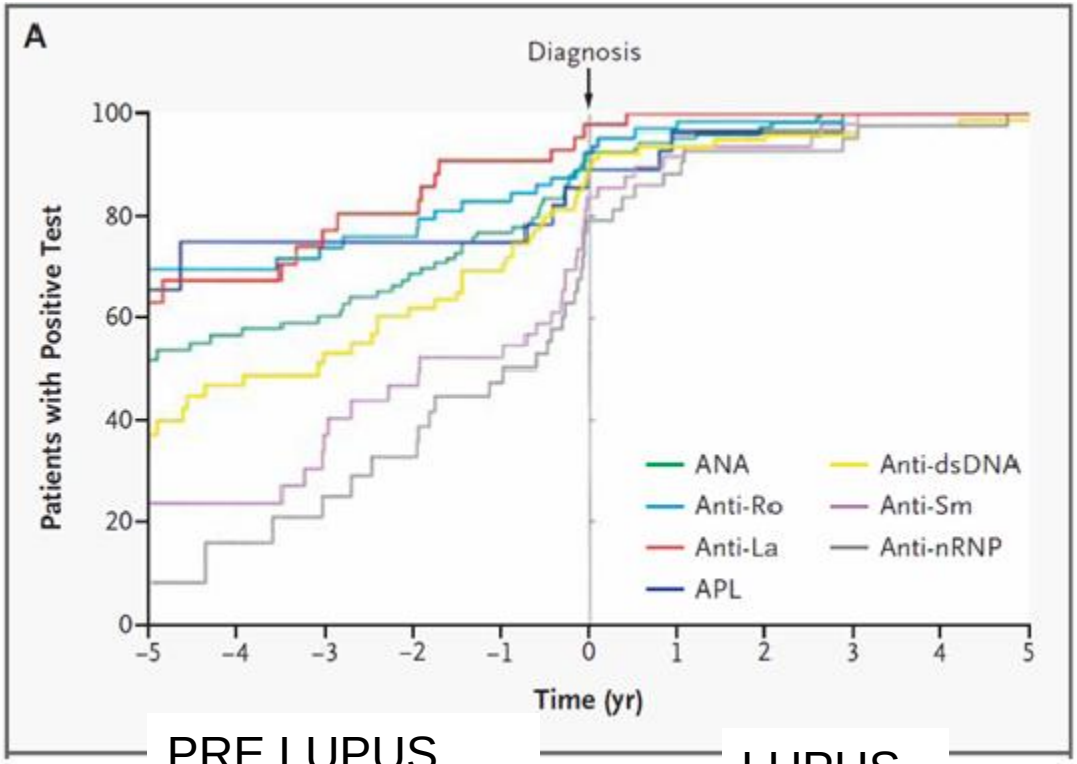
Connectives/ lupus

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus

Melissa R. Arbuckle, M.D., Ph.D., Micah T. McClain, Ph.D., Mark V. Rubertone, M.D., R. Hal Scofield, M.D., Gregory J. Dennis, M.D., Judith A. James, M.D., Ph.D., and John B. Harley, M.D., Ph.D.



PRE LUPUS

LUPUS

➔ Les auto-anticorps apparaissent avant les premiers signes cliniques

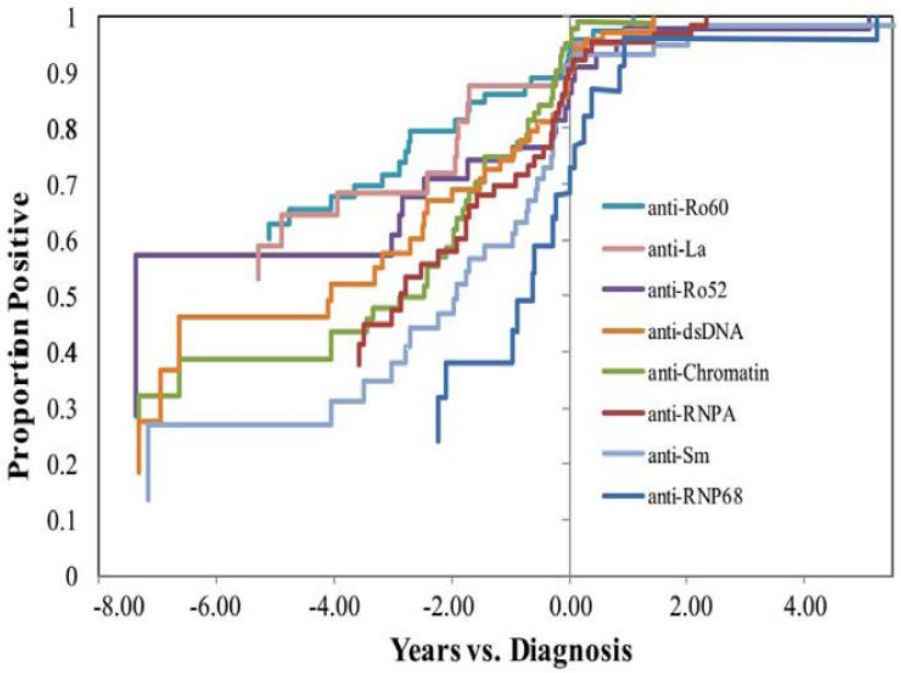
➔ Médecine PRECLINIQUE

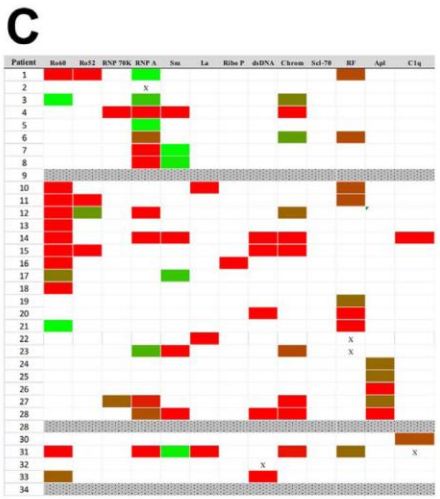
OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

60 kD Ro and nRNP A Frequently Initiate Human Lupus Autoimmunity

Latisha D. Heinlen[1,2,3], Micah T. McClain[1], Lauren L. Ritterhouse[1,2,3], Benjamin F. Bruner[1], Colin C. Edgerton[4], Michael P. Keith[5], Judith A. James[1,2,3], John B. Harley[2,3,6,7]*





➔ Les auto-anticorps apparaissent avant les premiers signes cliniques

➔ Médecine PRECLINIQUE

makoto.miyara@psl.aphp.fr

Laboratoire d'immunochimie et autoimmunité

- Jean-Luc Charuel
- Lucile Musset

Pneumologie Avicenne
Dominique Valeyre
Hilario Nunes
Diane Bouvry
Yurdagul Uzunhan
Boris Duchemann

Médecine interne 2
Pitié
Zahir Amoura
Julien Haroche
Alexis Mathian
Fleur Cohen
Laurent Arnaud
Du Boutin

Médecine interne 1
Olivier Benveniste
Yves Allenbach
Aude Rigolet

Pneumologie Tenon
Jean-Marc Naccache

Pneumopathies infiltrantes diffuses: Quels anticorps et pourquoi?

Dr Makoto MIYARA
APHP-Département d'immunologie
APHP-Médecine interne
Centre de référence lupus et syndrome des antiphospholipides