

GEAI 2016



Catherine JOHANET

département d 'Immunologie
Biologique, CHU Saint-Antoine, Paris

Anticorps anti-ADN et anticorps anti-nucléosomes

Colloque Nils-Olivier Olsson, GEAI, Paris 2016

INTRODUCTION

➡ **Ac anti-ADNdb:** inclus dans les critères diagnostiques du LES

- Depuis 1982 -ACR (American College of Rheumatology)
- Revalidés en 2012 -SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics)

➡ **Ac anti-nucléosomes:** incriminés dans la pathogénicité du LES dès 1994. leur intérêt en pratique courante reste sujette à controverse.

Hétérogénéité des techniques de détection et des antigènes utilisés

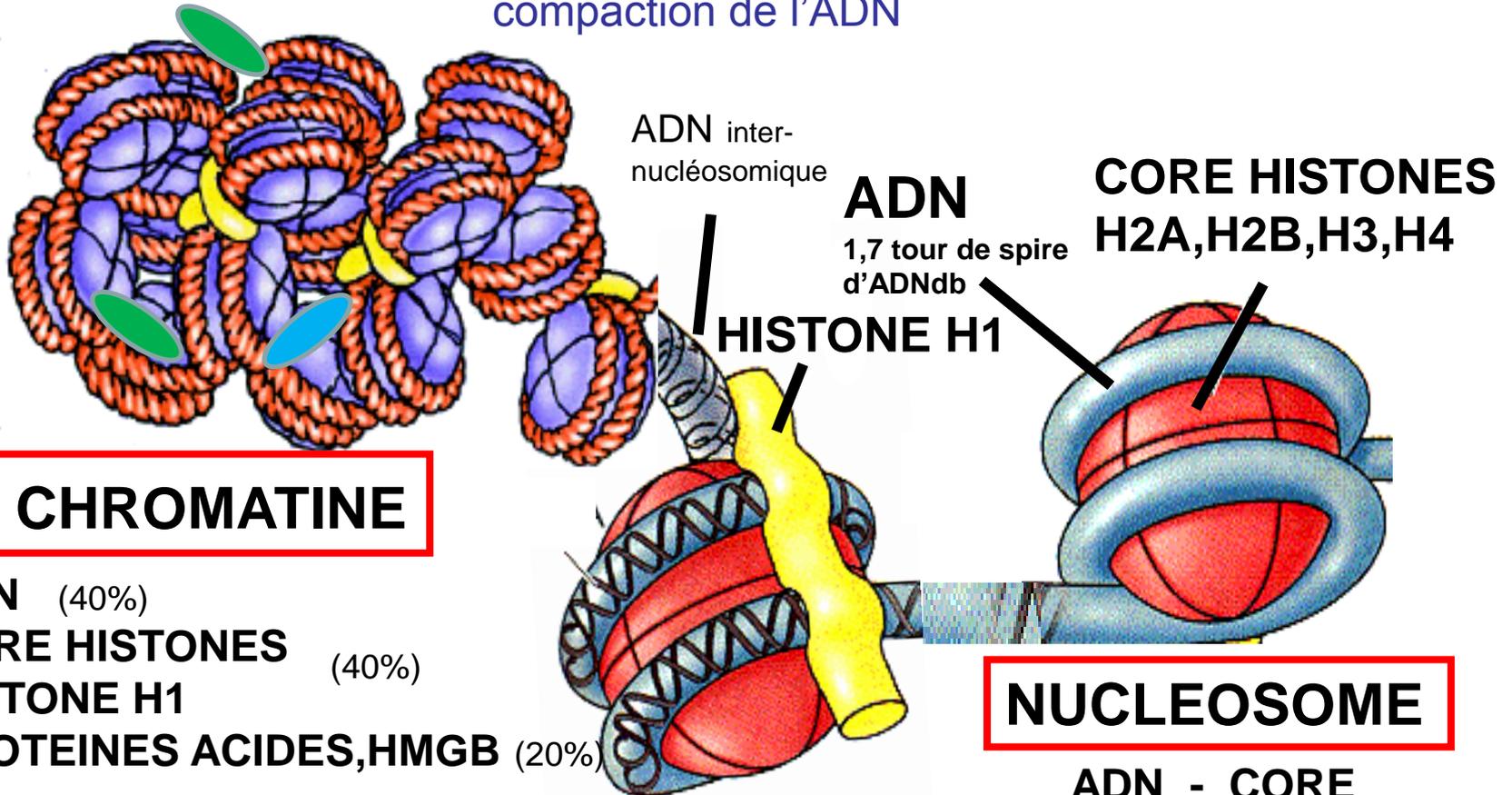
Objectifs

- ➡ Mise au point sur:
 - les cibles antigéniques reconnues par ces Ac
 - Les méthodes de détection
 - Leur signification clinique

- ➡ Détection des Ac anti-ADNdb: Comparaison Test de Farr vs technique multiplex basée sur la fluorimétrie en flux.

CIBLES ANTIGENIQUES

Nucléosome = unité fondamentale de la chromatine et premier niveau de compaction de l'ADN



CHROMATINE

ADN (40%)
CORE HISTONES (40%)
HISTONE H1
PROTEINES ACIDES, HMGB (20%)

Structure dynamique

CHROMATOSOME

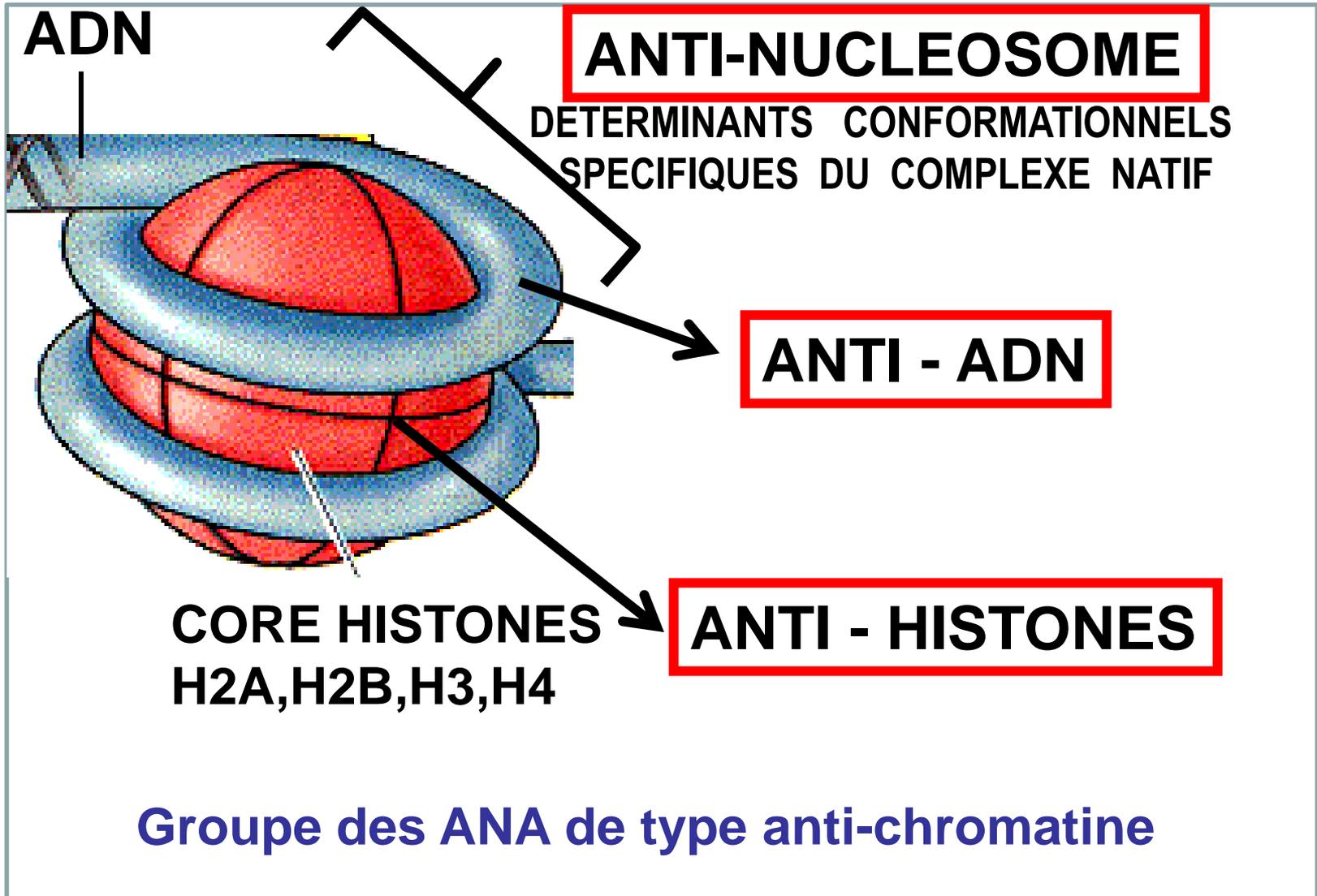
ADN - CORE HISTONES -
HISTONE H1(extranucléosomique, ferme l'ensemble)

NUCLEOSOME

ADN - CORE
HISTONES

CIBLES ANTIGENIQUES

La réponse immunitaire dirigée contre le nucléosome peut concerner:
Des constituants individuels ou le complexe natif



CIBLES ANTIGENIQUES



Ac anti-ADN monocaténaire

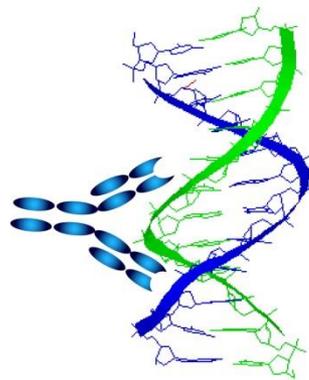
- souvent d'isotype IgM
- auto-Ac naturels
- faible affinité pour l'ADN
- réactions croisées avec d'autres Ag (thyroglobuline, myosine..)
- présents chez 20% des sujets sains

Ac anti-ADN bicaténaire ou db

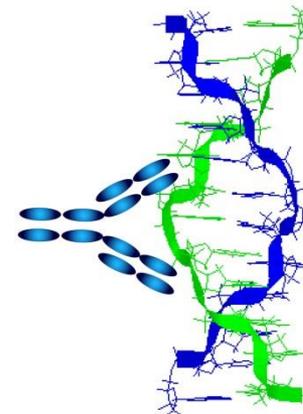
Ac dirigé contre la forme hélicoïdale droite ou B-ADN

Dirigés contre:

- des sites de liaison entre bases complémentaires de 2 brins d'ADN
- des structures conformationnelles de la double hélice



ADN Forme B
= hélicoïdale droite



ADN Forme Z
= hélicoïdale gauche

CIBLES ANTIGENIQUES

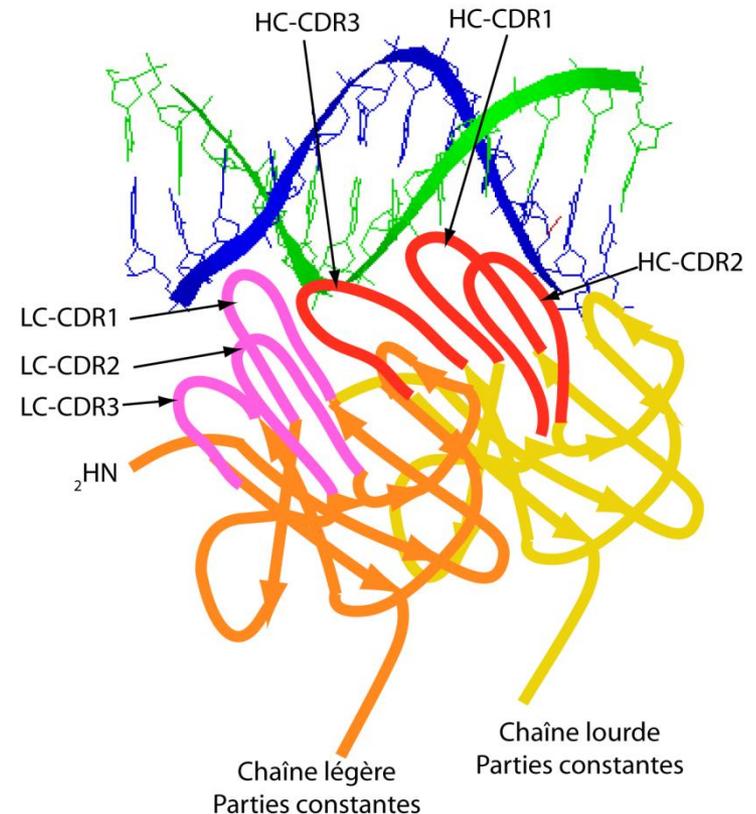
Interactions Ac anti-ADN et ADN

Utilisation d'Ac monoclonaux + analyse informatique de leur séquence

Interaction CDR1 et CDR2 (chaîne lourde) avec grand sillon d'ADN

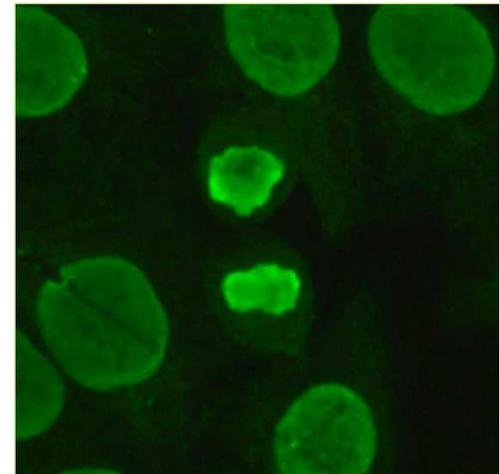
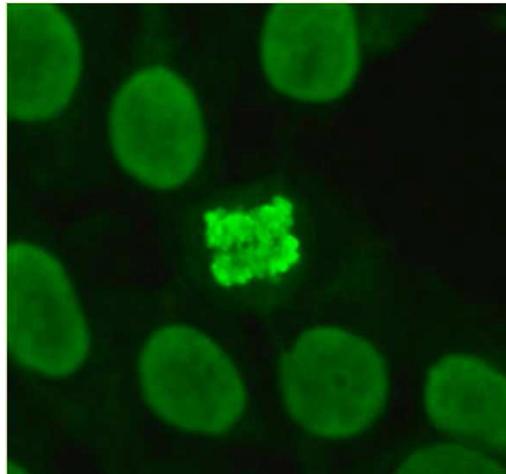
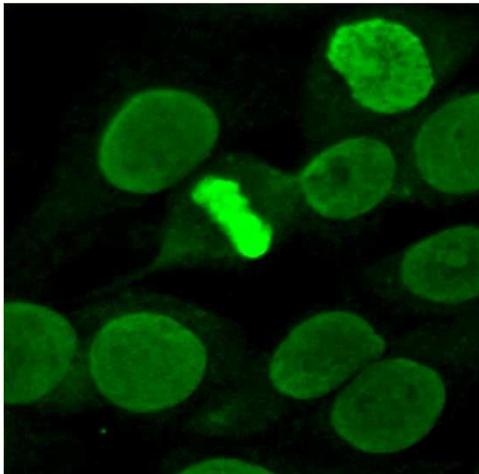
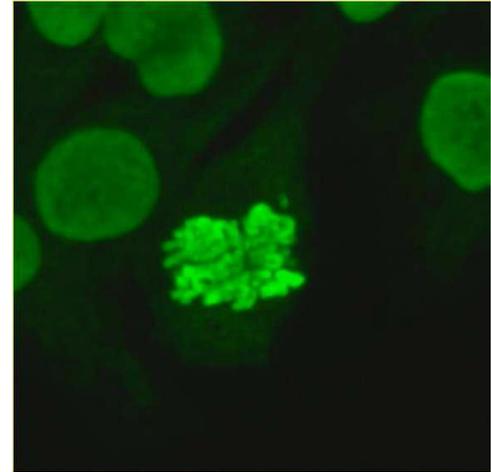
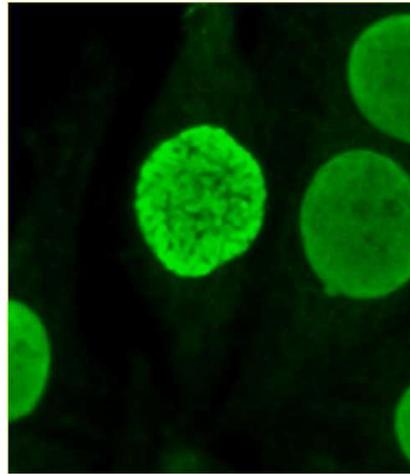
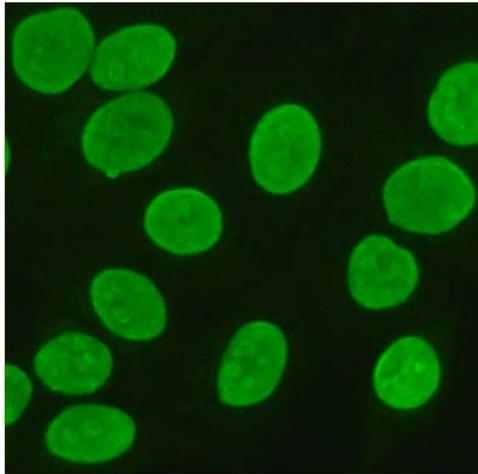
CDR1 (chaîne légère) avec petit sillon ADN

Importance de l'arginine dans des positions clé de la chaîne variable legere



METHODES DE DETECTION

ANA de type anti-chromatine. IFI sur cellules Hep-2



Ac anti-nucléosomes

- ➡ Tests:
 - ELISA
 - Immunodot
 - Système automatisé basé sur la fluorimétrie en flux
- ➡ Antigène:
 - Nucléosomes obtenus par extraction à partir de la chromatine provenant de lignées cellulaire (cellule HeLa) ou d'organes animaux (thymus de veau)

Ac anti-nucléosomes

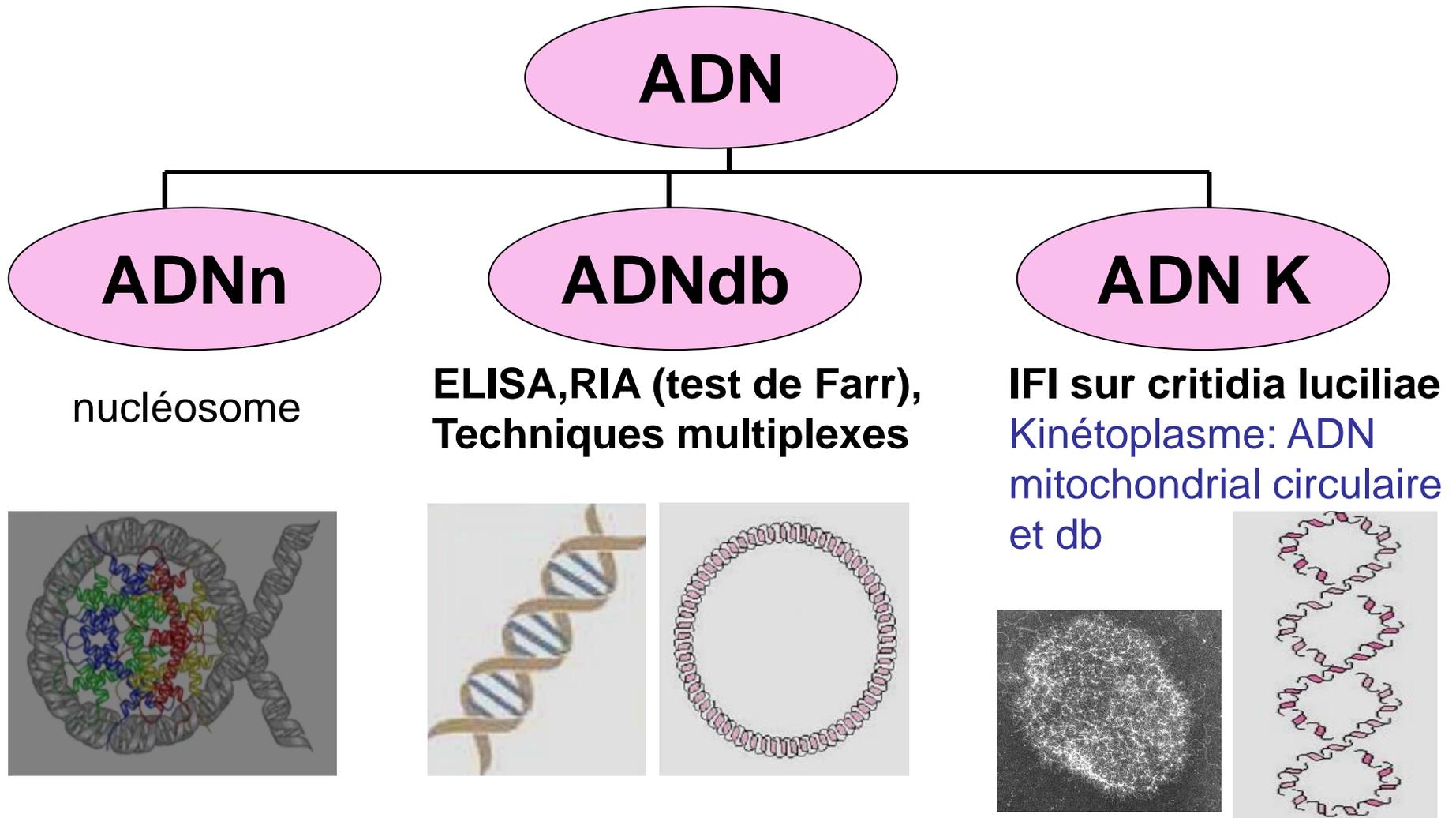
➡ Problèmes de contamination

Nucléosomes +/- contaminés par:

- des **subnucléosomes**,
- des **complexes d'histones**
- **Histone H1** → moins bonne spécificité pour le LES
(87,5% vs 95,7% nucléosomes sans histone H1)
→ Fréquence élevée dans la sclérodermie
- **Topoisomérase I (cible des Ac anti-Sc170)** → fréquence élevée d'anti-nucléosomes dans la sclérodermie

METHODES DE DETECTION

Différents types d'ADN utilisés



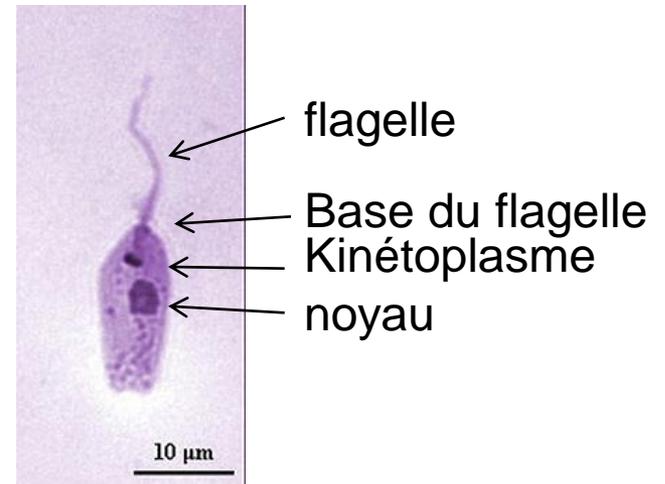
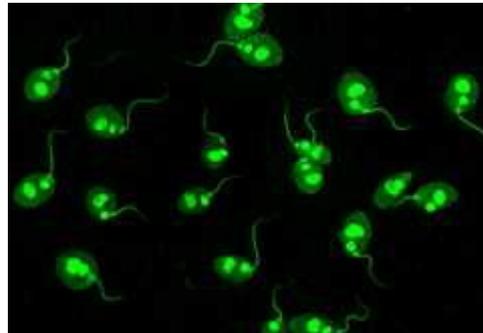
METHODES DE DETECTION

Ac anti-ADN k

- Antigène: kinétoplaste = ADN mitochondrial circulaire

- Source: *Crithidia Luciliae*

- Test IFI



spécifique, peu sensible

Possibilité de détecter les isotypes IgG et IgM

rapide

METHODES DE DETECTION

Ac anti-ADN db

- Antigène: ADNdb
- Source: ADNdb purifié (thymus de veau)
ADN bactérien circulaire, ADN recombinant, ADN synthétique
- Tests: RIA (test de Farr), ELISA
Techniques multiplexe (chimieluminescence , fluorimétrie en flux)

Farr

- Détecte uniquement les Ac anti-ADNdb de haute affinité
- peut détecter des IgM
- Problèmes liés aux radioéléments

ELISA

- Ac de haute et faible affinité
- Distingue les isotypes IgG et IgM
- Plus sensible, moins spécifique
- Problème de contamination ADNsb

techniques multiplexes

rapides et automatisables → fort développement

METHODES DE DETECTION

Techniques multiplexes: comparaison test de Farr vs fluorimétrie en flux

➔ **Population étudiée**, n = 559 (67% femme, clinique connue)

LES n = 129	Au diagnostic	n=12
	Suivi	n=105
	Suspecté	n=12
Autres connectivites (sclérodermie, sjogren...)		n=105
Cancers		n=15
Autres pathologies	Rhumatisme inflammatoire, MICI, hépatopathies, néphropathies	n=310

METHODES DE DETECTION

comparaison test de Farr vs fluorimétrie en flux

➡ Prévalence

Test de Farr: 22% vs fluorimétrie en flux: 14,5%

Indifférencié fluorimétrie en flux:

négatif ou positif faible en Farr → considéré négatif

➡ Concordance globale

FARR	n	Fluorimetrie en flux	n	n=559	
NEGATIF (≤ 7)	436	-	366	concordance	80,5%
		+	33		
		ind--> -	37		
POSITIF (≥ 8)	123	-	63		
		+	47		
		ind --> -	13		

METHODES DE DETECTION

comparaison test de Farr vs fluorimétrie en flux

➡ Population lupique

	Test de Farr	fluorimétrie en flux	<i>p</i>
LES: diagnostic n=12	11/12, 92%	7/12, 58%	ns
LES: suivi n=105	50/105, 48%	42/105, 40%	ns
LES avec néphropathie) n=38 (32%)	27/38, 71%	25/38, 66%	ns

Nécessité d'augmenter la population lupique au diagnostic

METHODES DE DETECTION

comparaison test de Farr vs fluorimétrie en flux

➡ Résultats discordants

17 patients: taux Ac modéré ou élevé >25ui par Farr ou fluorimétrie en flux

Farr >25 ui, fluorimétrie –	n=7	<ul style="list-style-type: none">- LES: n=6 (2 au diagnostic, 4 en suivi)- HAI: n=1
Farr -, fluorimétrie >25ui	n=10	<ul style="list-style-type: none">- LES traité: n=1- Connectivites: n=3 (2 sclérodermies, 1 sjogren)- Cancer: n=1 (cancer ORL)- Autres: n=5 (hépatite aigue, IRC, dorsalgie, SPA)

METHODES DE DETECTION

Ac anti-ADNdb

➔ Caractéristiques des principales méthodes de détection

	ADN	Affinité des Ac	Sensibilité/ LES
IFI crithidia Luciliae	ADN k	faible et haute	10 à 60%
Test de Farr	ADNdb	haute	85%
ELISA (purifié, recombinant, synthétique)	ADNdb	faible et haute	70 à 98%
Multiplex	ADN db (synthétique)	faible et haute	40 à 72%

SIGNIFICATION CLINIQUE: Ac anti-nucléosomes

Dans le LES

- ➡ Nombreuses études, différent par:
- Les techniques utilisées
 - Les critères d'évaluation de la maladie
- } Comparaison difficile

- ➡ Au diagnostic

Se: 45 à 100%
Sp: 73 à 100%

Nucléosomes dépourvus d'histone H1 → augmentation de la spécificité

- ➡ En suivi

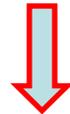
Peu d'études

Résultats discordants

SIGNIFICATION CLINIQUE: Ac anti-nucléosomes

Dans le LES

- ➡ Anti-nucléosome et anti-ADNdb
 - Titre des Ac anti-nucléosomes corrélé à celui des Ac anti-ADNdb (quelque soit la technique de détection des Ac anti-ADNdb)
 - Présence d'Ac anti-nucléosome en l'absence d'Ac anti-ADNdb (11 à 51%)



Apparition plus précoce que les Ac anti-ADNdb

SIGNIFICATION CLINIQUE: Ac anti-nucléosomes

Dans le LES

- ➡ Titre des Ac anti-nucléosome corrélé à l'activité de la maladie (score SLEDAI)

Étude strasbourgeoise 2015: cohorte de 48 patients lupiques
titres des Ac anti-nucléosome → non corrélés à l'activité de la maladie
titres des Ac anti-ADNdb → corrélés à l'activité

Mais: patients majoritairement traité avec un SLEDAI <10

Études utilisant d'autres scores (score ECLAM, score SLAM):
pas de corrélation

- ➡ Association Ac anti-nucléosomes et néphropathie lupique

Méta analyse (Bizzaro 2012):

13 études sur 22 → association significative entre Ac et néphropathie

SIGNIFICATION CLINIQUE: Ac anti-ADNdb

Dans le LES

➡ Marqueur diagnostique

Se: 60 à 100%

Sp: 90 à 100%

➡ Peuvent être présents avant l'apparition des signes cliniques

➡ Titres corrélés à l'activité de la maladie et à la sévérité de l'atteinte rénale

➡ En suivi: permet de prévoir les rechutes

SIGNIFICATION CLINIQUE: Ac anti-nucléosomes

Dans les autres MAI

➡ Connectivites

- PR: 5 à 10% avant traitement
15 à 30% traitement par anti-TNF
- SAPL: 7%
- Gougerot-Sjögren: 7 à 13%
- Connectivite mixte: 8 à 45%
- Sclérodermie: 7 à 80%

➡ Hépatopathies

- HAI: 28 à 53%

Taux baissent sous corticothérapie mais non corrélés à la réponse au traitement

Non lié à l'activité de la maladie (score METAVIR) (étude St Antoine)

- Formes mixtes CBP-HAI: 20%

SIGNIFICATION CLINIQUE: Ac anti-ADNdb

Dans les autres MAI

➡ Connectivites: PR, Gougerot-Sjögren, Sclérodémie: 10%

➡ Hépatopathies: marqueurs d'HAI et formes mixtes

- *Muratori, Am J Gastroenterol, 2009: anti-ADNdb par IFI*

	HAI (n=120)	CBP (n=120)	CBP/HAI (n=15)
Anti-ADNdb (%)	26%	4%	60%
AMA 2 + anti-ADNdb (%)	1%	3%	47%

- *Saint-Antoine, 2011: anti-ADNdb par test de Farr*

	HAI (n=40)	CBP (n=70)	CBP/HAI (n=31)	
Anti-ADNdb (%)	25%	3%	23%	➡ Taux identiques HAI: 21 ui OS: 18 ui
AMA 2 + anti-ADNdb (%)	0	3%	23%	
AMA 2 + anti-actine (%)	0	0	23%	
AMA2 + anti-actine et / ou anti-ADNdb (%)	0	3%	42%	

La combinaison AMA2 + anti-ML de type actine et/ou anti-ADNdb pourrait être proposée comme critère immunologique des formes mixtes.

Ac anti-nucléosomes

- Marqueurs d'activité du LES
- Corrélés à la néphrite lupique, aux cytopénies , au rash malaire
- Intérêt dans la maladie lupique sans Ac anti-ADNdb

**Ag pas toujours
parfaitement identifié**

**Résultats
contradictoires des
différentes études**



**Limitent l'intérêt de
leur recherche**

Ac anti-ADNdb

- Marqueurs diagnostiques du LES
- Corrélés à la sévérité de la néphrite lupique et à l'apparition des rechutes
- Marqueurs diagnostiques des HAI1 et des formes mixtes CBP-HAI

Résultats restent fonction de la méthodologie et de la source antigénique utilisée

Remerciements



département d'Immunologie Biologique,
Hôpital Saint-Antoine, Paris :

Dr P Reynaud
Dr Y Chantran
Dr C Desgruelles
Dr E Ballot



Laboratoire d'Immunologie,
Nouvel Hôpital civil, Strasbourg :

Dr B Nespola
Dr J Goetz

Pr RL Humbel - Luxembourg