



Hospices Civils de Lyon

Les Anticorps anti-cortactine

Rémi PESCARMONA

Nicole FABIEN

Réunion GEAI 13 mai 2016

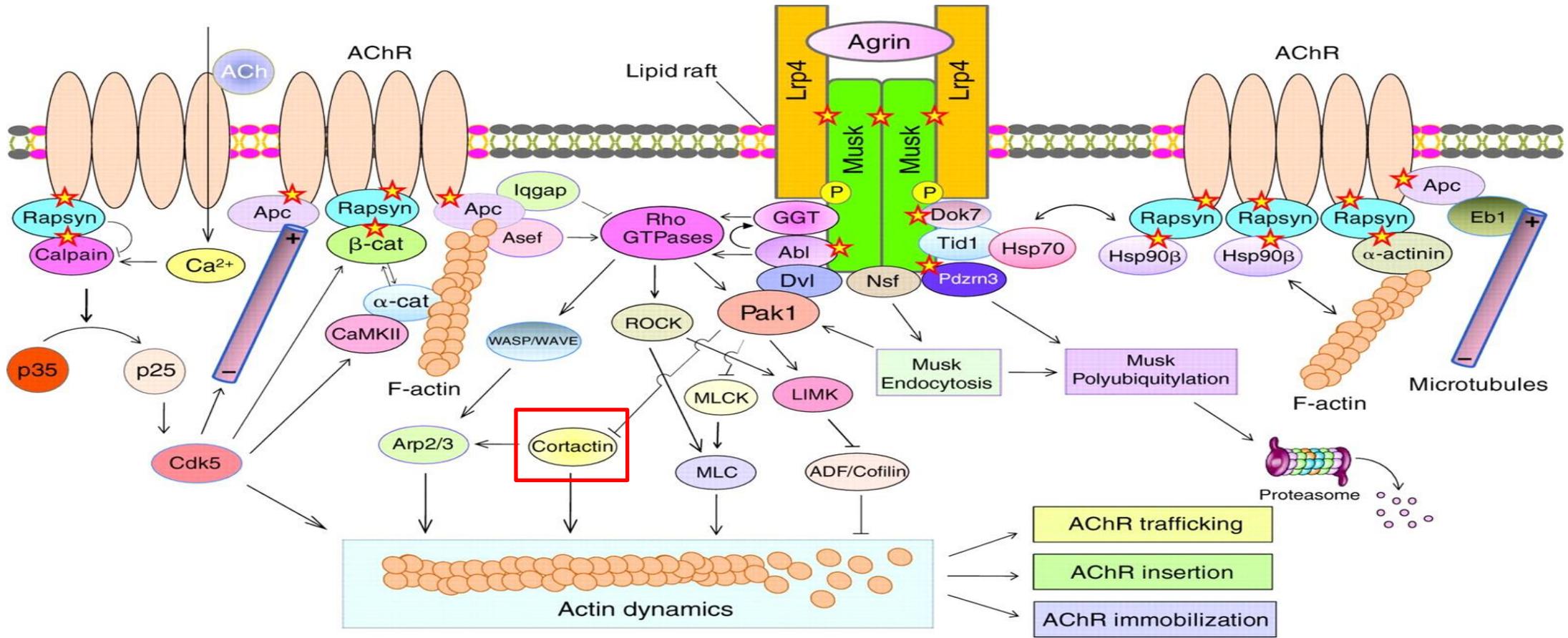
Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguás E, Grau-Junyent JM, Vilardell-Tarrés M, Juárez C.

Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin.

Autoimmun Rev 2014;13:1008–12

Cortactine

- Protéine de 68kDa localisée dans la jonction neuro-musculaire, majoritairement post-synaptique
- se lie à l'actine et régule sa polymérisation: formation des filaments
- Impliquée dans le regroupement des récepteurs de l'acétylcholine induit par l'agrine
- Hyperexpression de cortactine contribuerait: pathogénèse, croissance, invasion et métastases des cancers gastriques: modèles lignées cellulaires de cancers gastriques



Wu H et al. Development 2010;137:1017-1033

Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis

- 80% Ac anti-AchR (anticorps bloquants, destruction de la membrane): formes oculaires et généralisées
 - 5 à 10% Ac anti-MuSK (défaut d'aggrégation des récepteurs à l'AchR): formes généralisées sévères, atteintes respiratoires
 - 5 à 10% Ac anti-LRP4 (défaut d'aggrégation des récepteurs à l'AchR): formes généralisées légères et formes oculaires
- 5 à 10% SNMG (SeroNegative Myasthenia Gravis)
- Découverte de la cortactine:
 - Puce microarray avec 9000 protéines incubée avec pool de sérum de 6 SNMG → Cortactine est la 4^{ème} protéine majoritaire
 - Pleckstrine, BAI1 associated protein , fibronectine type III domain containing 8 , 5eme MusK

Berrih-Aknin S. Cortactin: A new target in autoimmune myositis and Myasthenia Gravis. Autoimmun Rev 2014;13:1001–2

Gallardo E, et al. Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. Autoimmun Rev 2014;13:1003–7

Dosage par ELISA maison

- Incubation 1 nuit à 4°C de plaques ELISA recouvertes de 100ng de cortactine purifiée recombinante (OriGene, Rockville, Maryland, USA) diluée dans du PBS
- Incubation 1h avec tampon (PBS lait écrémé 10%) à T° ambiante
- Lavage
- Incubation 1h à T° ambiante avec le sérum dilué au 1/100 dans du tampon (échantillons en duplicates)
- Lavage
- Incubation 1h à T°C ambiante avec un Anti-IgG couplé à l'HRP
- Lavage
- Révélation par le TMB et lecture à 450 nm

Dosage par Immunoblot

- Application de 5µg de cortactine purifiée recombinante (OriGene, Rockville, Maryland, USA) sur un gel de polyacrylamide (4-12%) avec du tampon MOPS
- Transfert sur membrane de nitrocellulose
- Incubation 1h à T°C ambiante des bandes dans du PBS Tween 0,05%
- Incubation avec le sérum dilué au 1/100^{ème} dans du tampon de blocage 1h à T°C ambiante
- Lavage
- Incubation 1h à T°C ambiante avec un Anti-IgG couplée à la phosphatase alcaline
- Révélation avec une solution de BCIP/NBT

Résultats

	SNMG	SPMG 69 Achr+ 34 MuSK+	LEMS	CIDP	SEP	Lupus	PR	Connectivite mixte	Polymyosite	Raynaud	Acrocyanose	Sclérodermie	Patients sains
Patients	91	103	30	6	3	12	8	3	3	2	1	2	19
ELISA Positifs	18 (19,7%)	5 (4,8%)	1 (3,3%)	2	0	1	1	0	0	0	0	1	1 (5,2%)
Confirmation des ELISA positifs par WB	14/18	5/5	0	3/5								1/1	

*SNMG: myasthénie seronégative (AchR + LRP4 +Musk: négatifs) ; SPMG myasthénie seropositive(AchR + LRP4 +Musk: négatifs) :
LEMS: Sd Myasthénique de Lambert Eaton; CIDP: Polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique*

- Avec un seuil de positivité Cut Off ELISA : 0,2 (Pas de détails sur le calcul de ce seuil)
- 5/40 : 12,5% autres MAI
- 23 patients myasthéniques sont positifs pour les Ac anti-cortactine en ELISA (11,9%):
 - 68,2% femmes
 - 22,2% de forme oculaire
 - 77,8% de forme généralisée
 - 5 patients du Groupe *myasthénie seropositive* sont RAch +, LRP4 et Musk négatifs
 - 1 thymome (Ac anti-AchR +)

Résultats

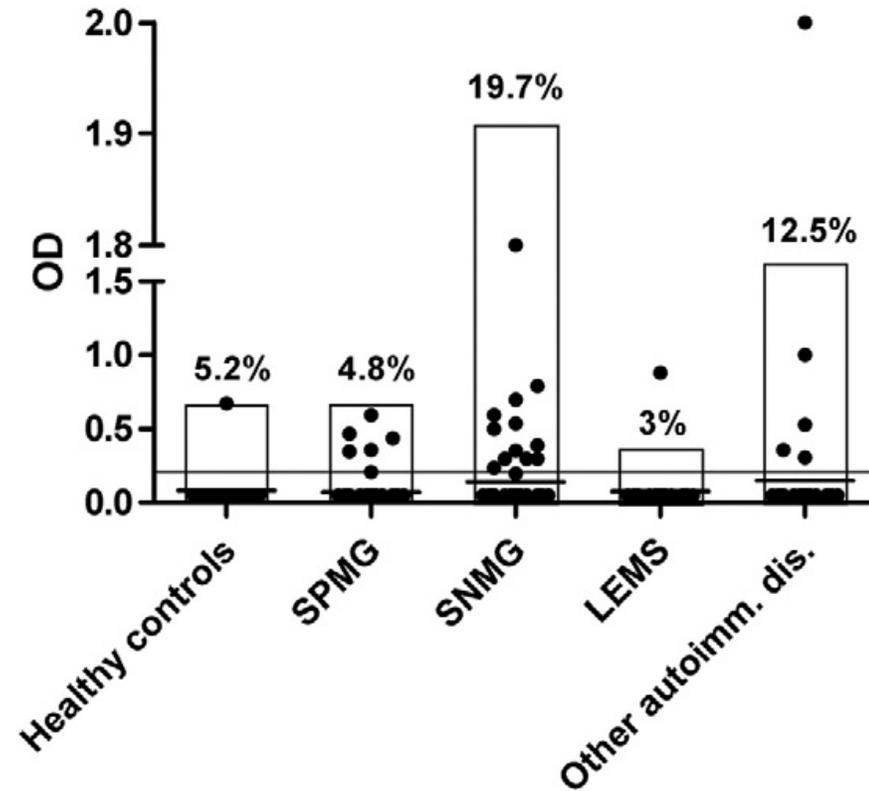


Fig. 1. Representation of anti-cortactin antibodies tested by ELISA. The cut-off value for positive results was established at 0.2 absorbance units (horizontal line over the X-axis).

Discussion

- 11,9 % patients myasthéniques positifs pour les Ac anti-cortactine
Dont 19,7% dans les myasthénies séronégatives ac classiques

Phénotype particulier ac anti-RACH+/cortactine+ ?

- Spécificité / autres MAI: 87,5%

Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin

- Certains patients positifs en ELISA pour les anticorps anti-MDA5 ou anti-HMGCR

Négatifs / 140 ou 97 kDa en Westernblot

Positifs avec une protéine de 68kD → Identification par spectrométrie de masse

Cortactine: contaminant de protéines recombinantes: MDA5 ou HMGCR utilisées en WB

- ELISA: idem autre technique plaques ELISA : 2 mg/mL de cortactine purifiée recombinante (OriGene, Rockville, Maryland, USA)
- Wblot : 5 mg/mL de cortactine purifiée recombinante ou MDA5 (OriGene) ou HMGCR (domaine catalytique Sigma) (4- 12% SDS)

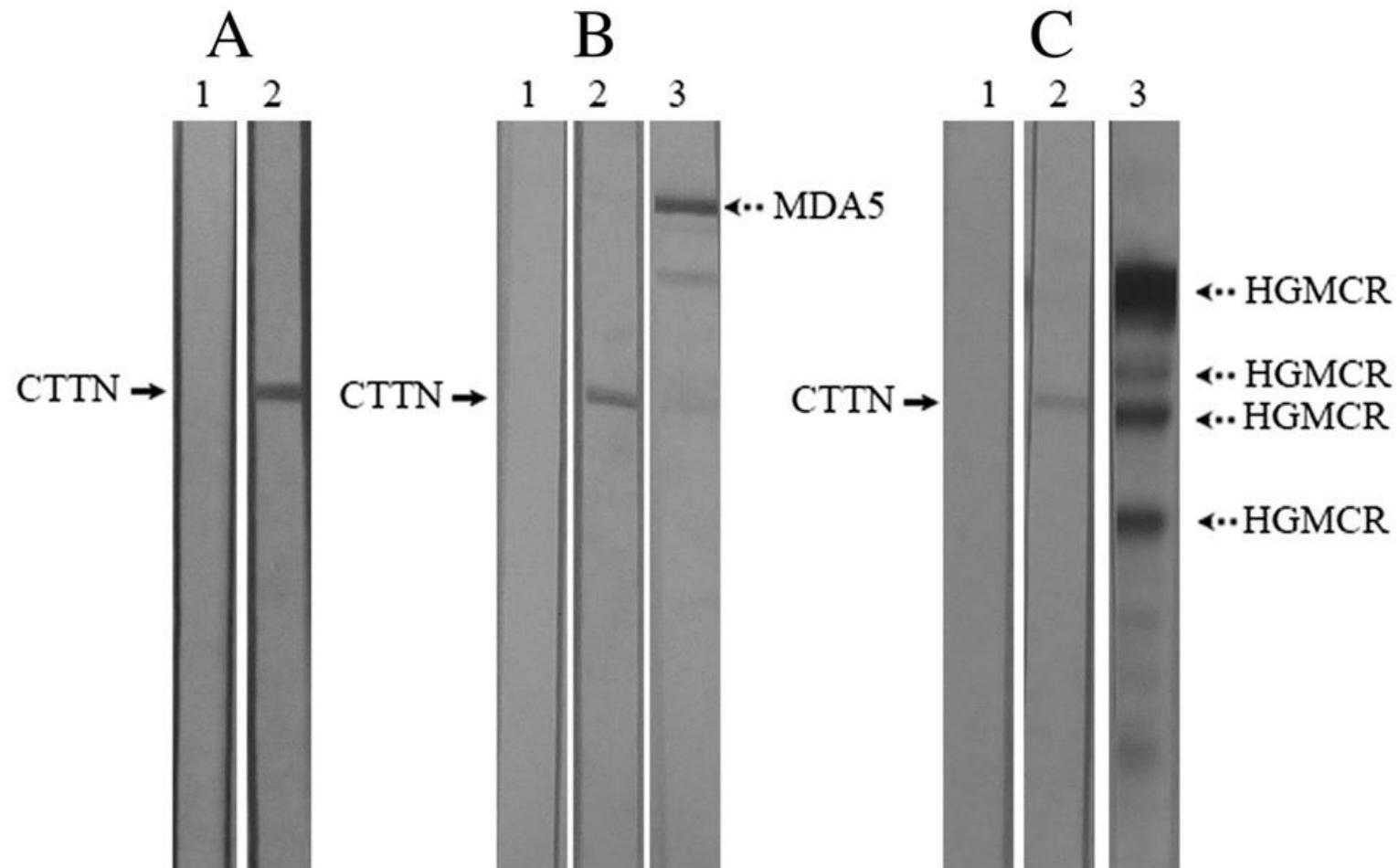


Fig. 1. Immunoblots showing reactivity of IgG antibodies from myositis patients against commercially available purified recombinant Cortactine: CTTN (panel A), MDA5 contaminated with CTTN (panel B), HMGCR contaminated with CTTN (panel C). Lane 1 same negative serum, lane 2 same positive serum against CTTN lane 3 specific positive sera against MDA5 and HMGCR, respectively

Résultats

	DM	PM	IMNM	IBM	Sclérodermie	LES	PR	Sjogren	Myopathies non inflammatoires	Patients sains
Patients	117	34	7	4	41	25	25	10	29	25
Positifs (ELISA confirmé par WBLOT)	9 (7,7%)	7 (20,6%)	2 (28,6%)	0	2 (4,9%)	1 (4%)	0	0	1 (faible positif)	0

DM: Dermatomyositis; PM: Polymyositis; IMNM: Immune-Mediated Necrotizing Myopathy; IBM: Inclusion Body Myositis

- 162 adultes atteints de myosite (121 femmes)
- Cut-Off ELISA: 0,3 (Moyenne de 25 patients sains + 5ET)
- Très bonne corrélation BLOT/ELISA pour DO > 0,4 (positif) et DO < 0,3 (négatif).
- Discordances entre 0,3 et 0,4.

Résultats

Patient	Age, y/Sex	Muscle biopsy	MSA/MAA	Anti-CTTN (ELISA/IB)	CK (UI/L)	ILD	Arthritis	Raynaud phenomenon	Skin manifestations	Fever	Dysphagia	Cancer	HLA-DRB
1	56/M	PM	U1RNP	0.957/+++	1390	Yes	No	Yes	No	No	Yes	No	DRB1*14,15
2	48/M	PM	Jo1/Ro52	1.138/+++	14,765	Yes	Yes	No	No	No	Yes	No	DRB1*11
3	48/M	PM	U1RNP	0.390/+	4450	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	No	N/A
4	43/F	PM	Ro52	0.309/+	345	Yes	No	Yes	Telangiectasia Poikiloderma	Yes	Yes	No	DRB1*03,08
5	38/M	IMNM	SRP	0.573/++	2686	No	No	No	Mechanic's hand	Yes	No	No	DRB1*03,01
6	22/F	PM	EJ	0.366/+	476	No	No	Yes	No	No	No	No	DRB1*07,15
7	50/F	DM	Jo1/Ro52	0.329/+	271	Yes	No	Yes	Mechanic's hand Gottron papules Heliotrope rash	No	No	No	DRB1*03,04
8	63/M	PM		0.505/++	451	Yes	No	No	No	No	No	Lung	N/A
9	74/M	PM		0.413/++	1200	No	No	No	No	No	No	No	N/A
10	52/F	DM	Mi2/Ro	0.479/++	902	Yes	No	No	Gottron sign Heliotrope rash	Yes	No	No	DRB1*03,04
11	60/F	DM	PM/Scl	0.970/+++	558	Yes	Yes	No	Mechanic's hand Gottron sign	No	No	Breast	DRB1*11,13
12	78/F	DM	Ro	0.451/++	234	No	Yes	No	Gottron sign	No	No	Pancreas	DRB1*07,14
13	42/F	DM	Jo1/Ro/Ro52	0.329/+	2500	Yes	Yes	No	Mechanic's hand Heliotrope rash	Yes	Yes	No	DRB1*03,08
14	63/F	DM	Jo1/Ro52	0.482/++	2000	Yes	Yes	Yes	Mechanic's hand Gottron sign	No	No	No	DRB1*03,04
15	38/M	DM	Jo1/Ro52	0.331/+	27,000	Yes	Yes	No	Mechanic's hand	Yes	Yes	No	DRB1*03,11
16	22/F	DM	PM/Scl	0.404/++	2096	Yes	Yes	Yes	Mechanic's hand Gottron sign Calcinosis	No	Yes	No	DRB1*03,01
17	77/M	IMNM		0.343/+	3000	No	Yes	Yes	No	No	Yes	No	DRB1*04,11
18	42/M	DM	TIF1 γ	0.345/+	300	No	No	No	Gottron sign	No	Yes	Lung	N/A

Clinical characteristics and immunologic profile in a series of 18 myositis patients with anti-CTTN antibodies.

Conclusion

- Intérêt dans le diagnostic de polymyosite et myopathie nécrosante autoimmune
 - 7/34 (20,6%) 2/7 (28,6%)
- Phénotype clinique?
- 11 des 18 positifs sont aussi positifs ac des myosites (Jo1/EJ/SRP/Mi2/TIF/PMScl)

Conclusion

Confirmer les ELISA positifs en MDA5 ou HMGCR par Wblot (faux positifs)?

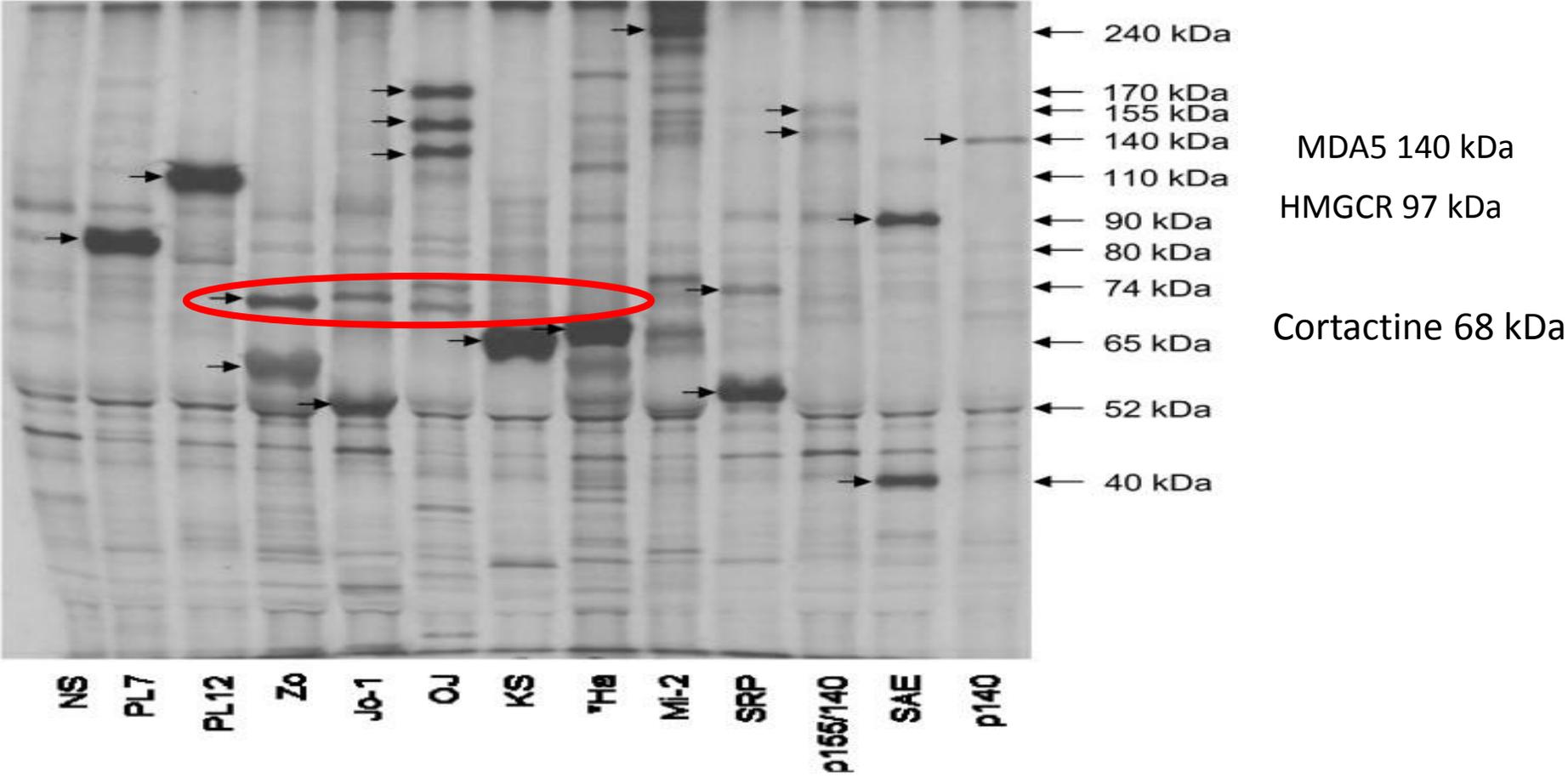
Confirmer les dot positifs en MDA5 ou HMGCR par Wblot?

Ou par ELISA anti-cortactine?

Intérêt en clinique de doser les ac anti-cortactine: myasthénie SN et myosites ou myopathies?

1/26	Ac anti-HMGCOA R	
numero	ELISA IL seuil à 20 UA	dot DTEK scan seuil 10
151553194	49	visu+/- scan négatif
151907474	36	14
160388175	208	14
140131083	104	POSITIF ++
140100287	205	POSITIF +++
140573168	200	POSITIF ++
140622012	233	POSITIF ++
140809839	210	POSITIF ++
140824440	198	POSITIF ++
141066084	120	POSITIF ++
150621394	62	POSITIF +++
150850942	216	63
150915758	230	POSITIF +++
151194527	193	55
151570875	186	33
151969050	193	60
152347122	219	76
152347122	229	76
152376526	189	61
160138922	205	85
160238031	212	69
1300003196	200	POSITIF ++
1300069543	231	POSITIF +++
1300274546	227	POSITIF +
0141499958	194	POSITIF +++
0150340866	185	positif +++

Autoanticorps rares des myosites:RIP



D'après Betteridge *et al.* Arthritis Res Ther 2011;13:209.

Références

- Gallardo E, et al. Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev* 2014;13:1003–7
- Labrador-Horrillo M, et al. Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin. *Autoimmun Rev* 2014;13:1008–1
- Berrih-Aknin S. Cortactin: A new target in autoimmune myositis and Myasthenia Gravis. *Autoimmun Rev* 2014;13:1001–2

Figure 2

en consultation ce j
"votre interne m'avait dit de doser calpotrectine foetale et le
biologiste m'a dit que ce n'était pas possible puisque je n'étais
pas enceinte!"