

MALADIES AUTO IMMUNES

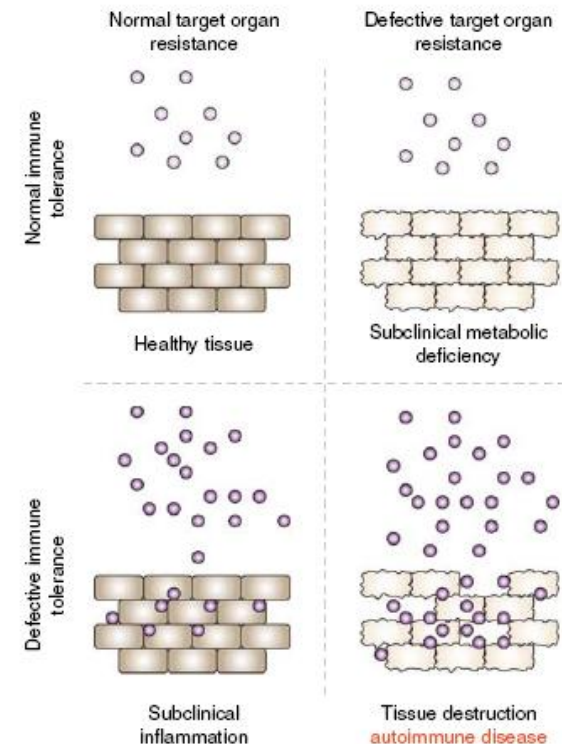
- **MECANISMES et EXPLORATION**
- **EXEMPLES**

Dr Sylvia Benzaken,
Laboratoire central d'Immunologie, CHU Nice l'Archet

Maladies auto immunes :

Définition

- **MAI** = pathologies caractérisées par une réponse immunologique contre les constituants du Soi, qu'elle soit à prédominance cellulaire ou humorale.
- **MAI** = rupture de la tolérance
- **Biologie** =
« microscope et stéthoscope du 21ème siècle »



Autoimmunity
Beyond the immune system

Adrian Liston

Immunology and Cell Biology (2008) 86, 295–296; doi:10.1038/icb.2008.10; published online 26 February 2008

Caractéristiques des MAI₁

- **5 à 7%** de la pop°, après K et affections CV
- **Evolutivité** variable
- **Syndromes chevauchants** (connectivites mixtes)
- **Diagnostic tardif** / début de la maladie
- **Prise en charge précoce** : éviter complications (pronostic vital dans LED ou handicap majeur, cécité de M Horton)

Caractéristiques des MAI₂

- **Etude des mécanismes** en jeu pour ajuster les Traitements:

Anti inflammatoires

>>>> Immunothérapie spécifique

- **Classification MAI**

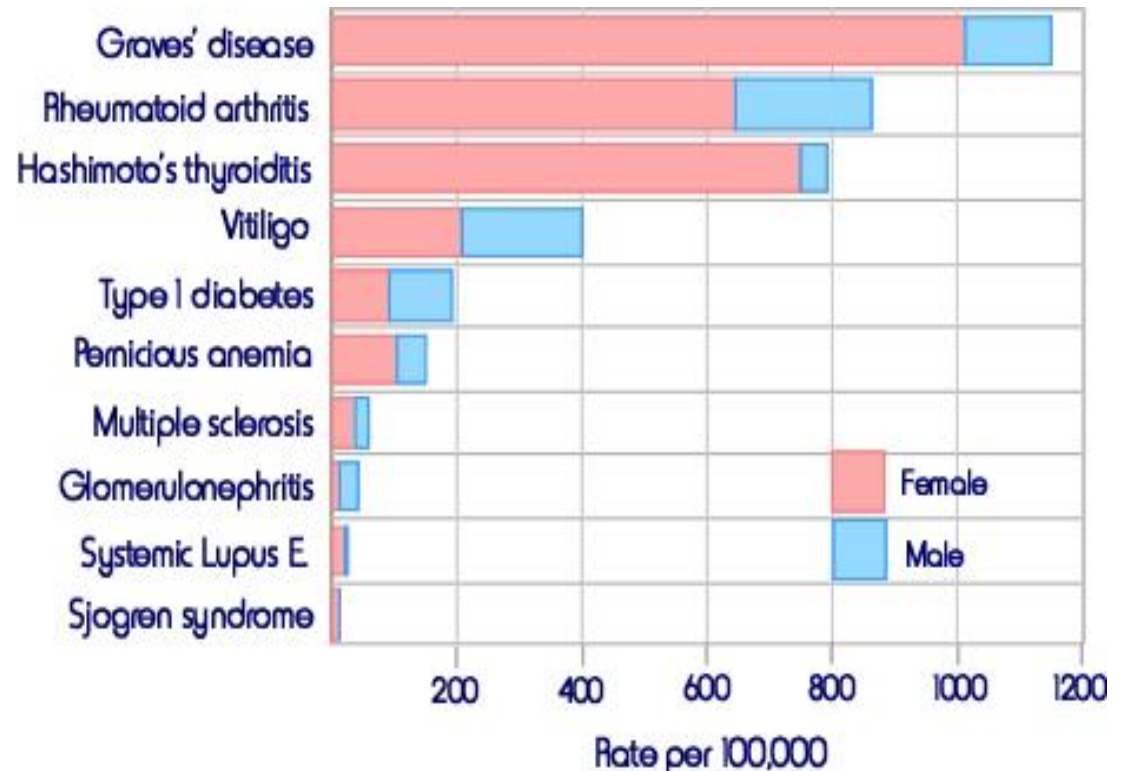
/ la cible :

- ORGANE : DID, CBP, M Coeliaque
- SYSTEMIQUE : LED, PR

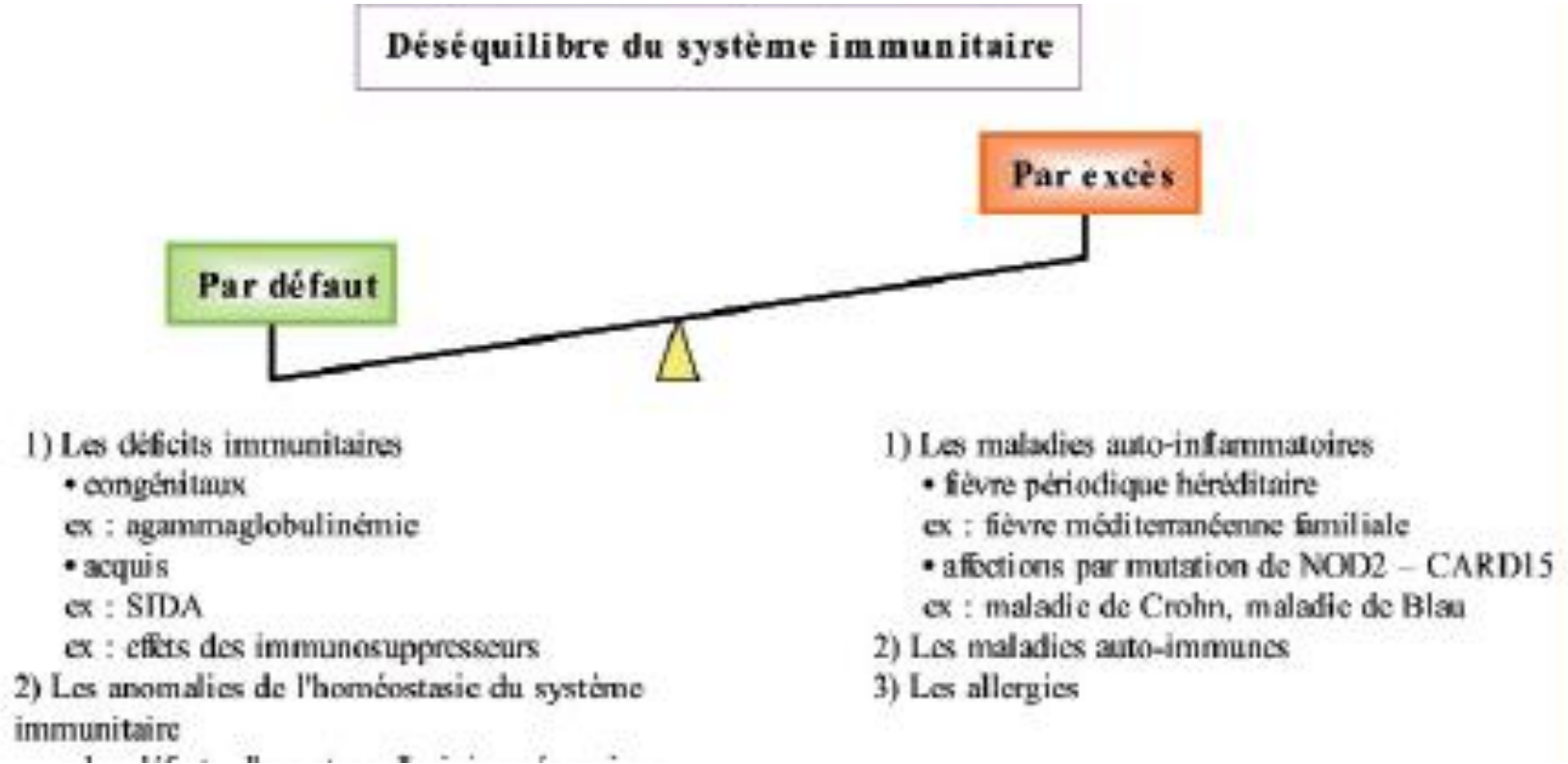
/ RI humorale ou cellulaire, selon HLA Classe 1 ou 2...

Caractéristiques des MAI₃

- **Susceptibilité féminine** importante

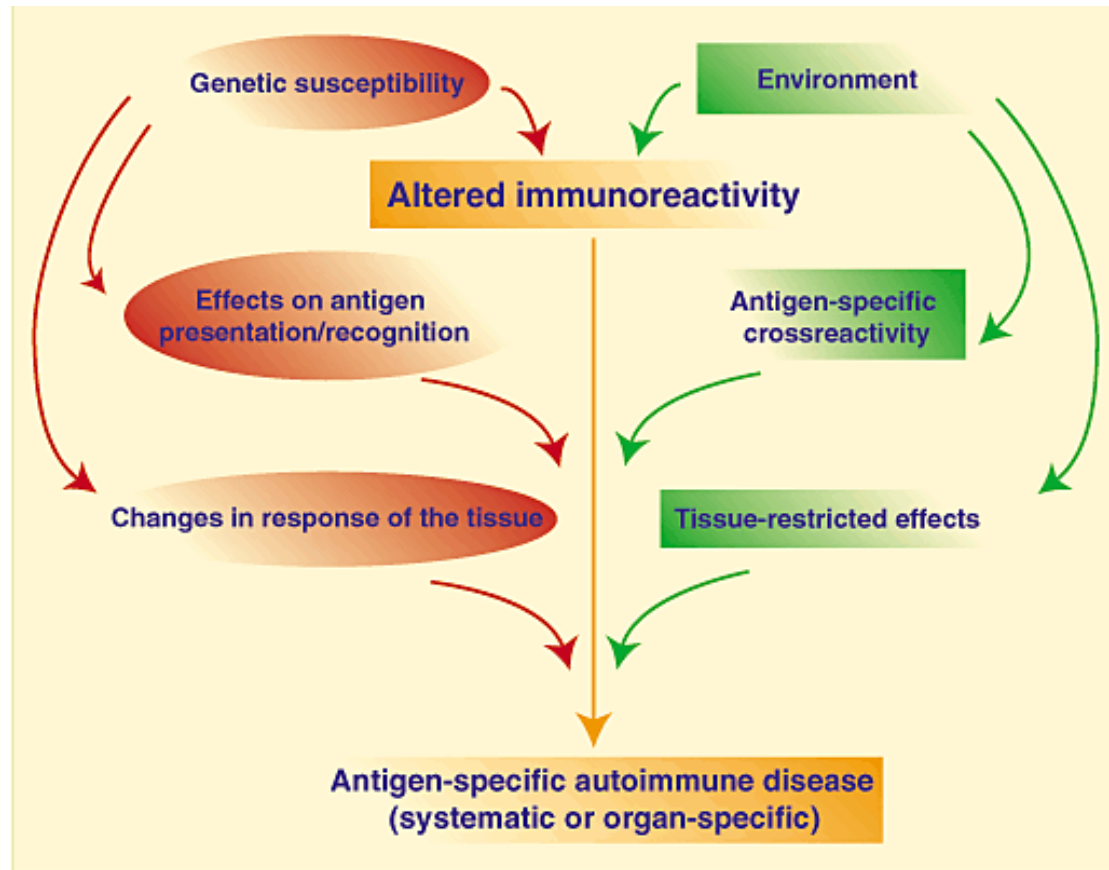


Les déséquilibres du système immunitaire



Déclenchement des MAI : activation de la réponse auto immune

H
O
T
E



E
N
V
I
R
O
N
N
E
M
E
N
T

Mécanismes des MAI

- **Diminution de la tolérance... immunisation contre un Ag du soi (auto Ag)**
 - Modifications d'un Ag (agents infectieux, UV..) ou apparition d'un Ag jusque là sanctuarisé (cristallin)
 - Modifications de la réponse immune liées à une anomalie génétique, déficit des cellules T régulatrices...
- **Augmentation de la réponse immunitaire / Ag du soi : rupture de la tolérance**
 - Réactivité croisée Ag étranger/Soi ou expression aberrante d'une molécule co stimulatrice
 - Rôle des Toll Like Receptors : interfaces entre immunité innée et immunité acquise
 - Anomalies génétiques de la costimulation ou de la production des cytokines proinflammatoires (TNF) ou régulant TH1/TH2 (IFN)

Rappel, : Tolérance centrale (Thymus)

Sélection lymphocytes T selon

l'affinité TCR ↔ Complexe MHC-peptide

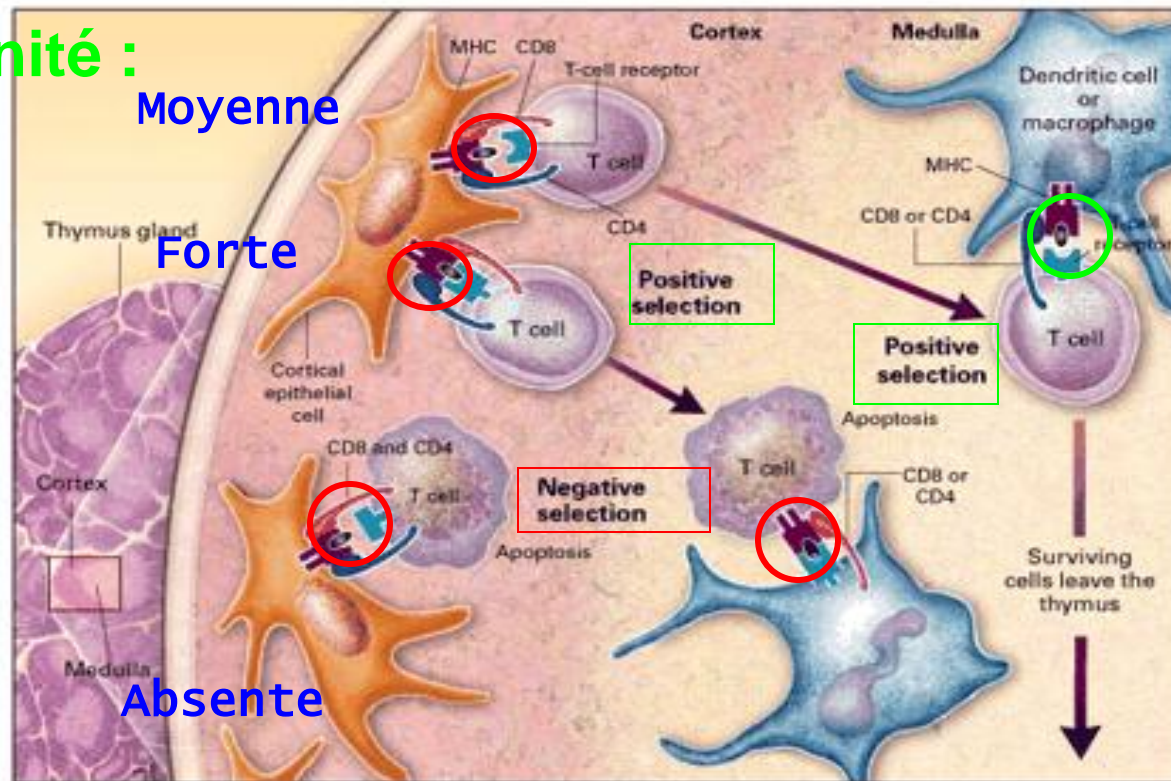
Moyenne, Forte ou Faible/Absente

Affinité :

Moyenne

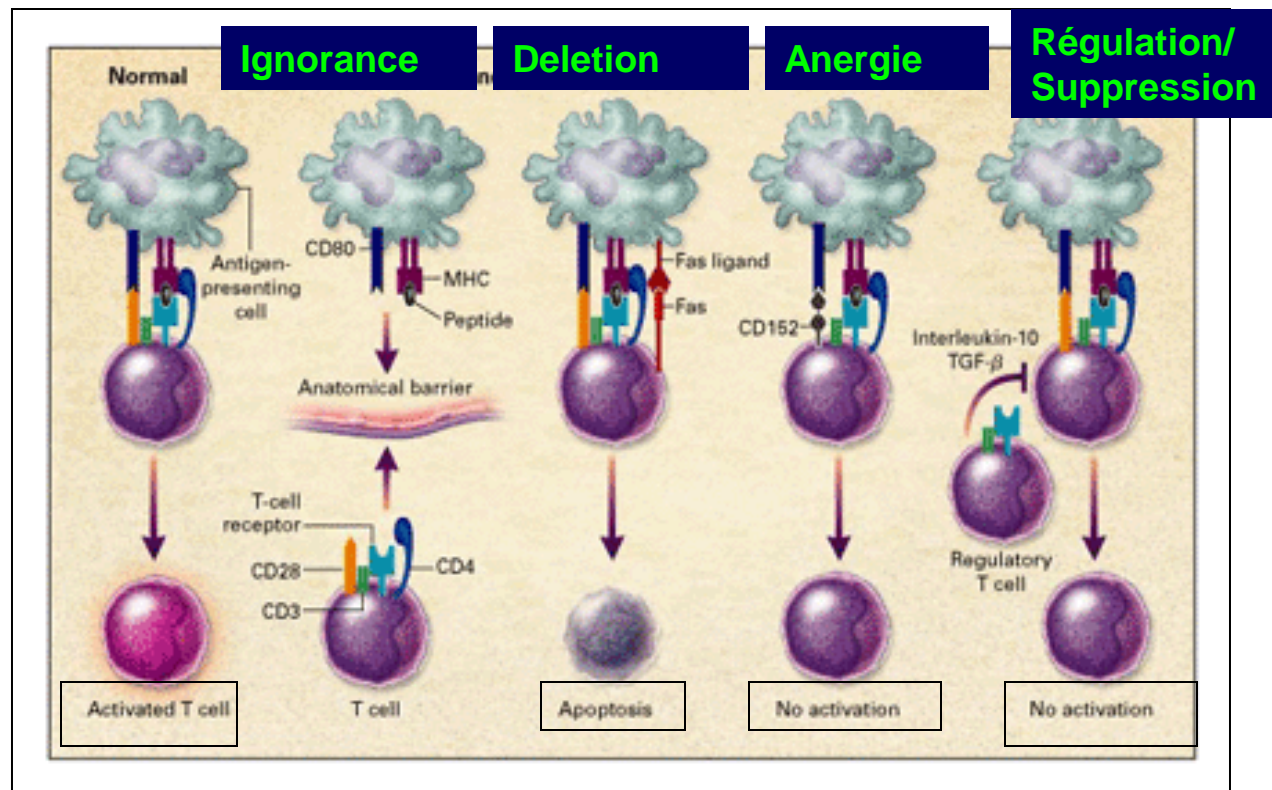
Forte

Absente



Rappel₂: Tolérance périphérique :

/IGNORANCE
/DELETION
/ANERGIE
/ T REGULATRICES



Rappel₃ : Rôle des TLR en auto immunité

E.D. Papadimitraki et al. / Journal of Autoimmunity 29 (2007) 310-318

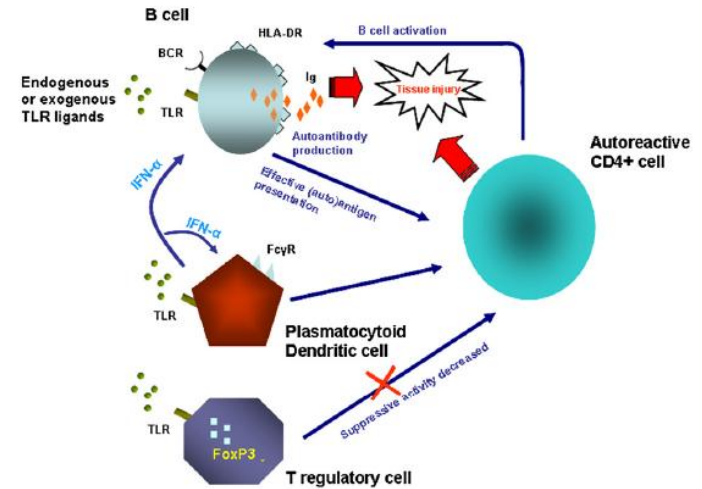
Activation des TLR et Auto immunité :

Lymphos B: activat° et augment° capacité CPA envers CD4/HLA Dr

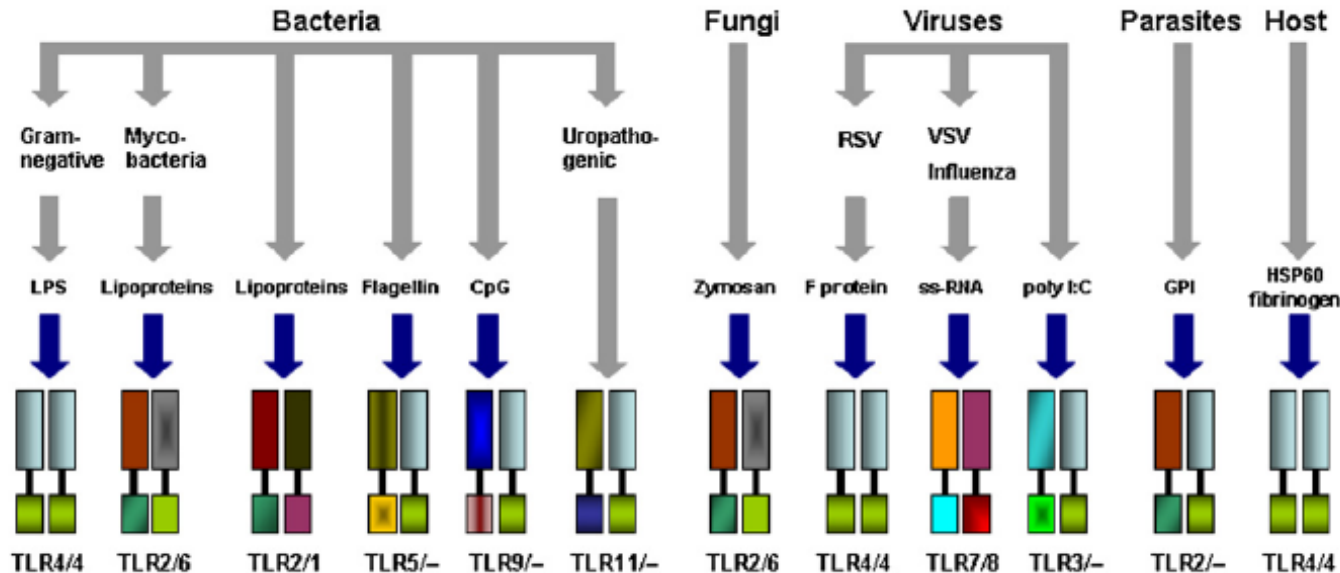
Sécrétion+++ IFN α >>>> différenc° des B et prod° auto Ac.

T auto réactifs activés

T régulateurs : activité suppressive /CD4 perturbée

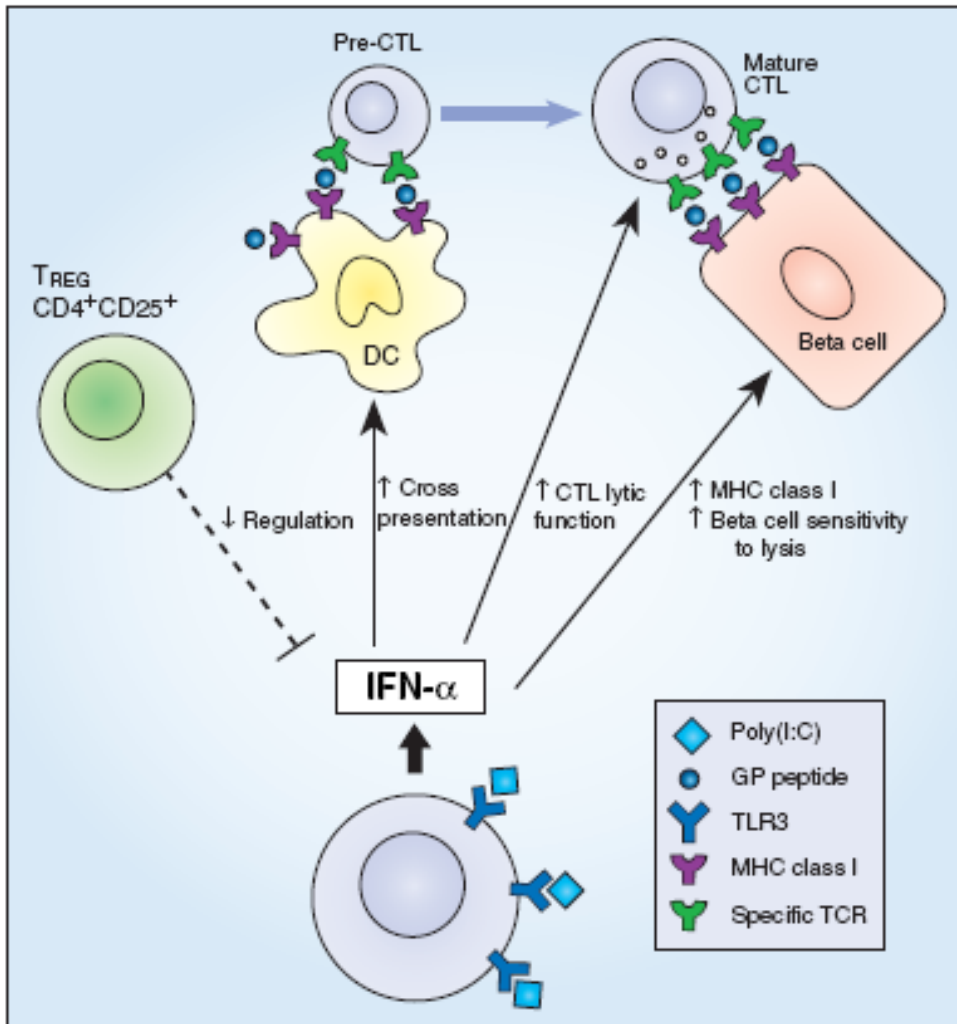


Ligands des TLR



es, janvier 2011, SB

Rappel₄ : Rôle des TLR et IFN alpha en auto immunité (ex : Diabète)



Activation de TLR3 >> production IFN α +++ qui va activer la réponse auto immune anti cellules beta (infectées par un virus) par différents mécanismes :

- Augmentation de la présentation peptide viral
- Augmentation activité lytique CTL
- Surexpression des molécules MHC classe I
- Blocage de la régulation par les CD4+CD25+

Mécanismes d'action de la réponse auto immune

- **Auto-Anticorps sur les tissus-cibles**
 - Mécanismes : /Cytolyse, fixation des immuns complexes, opsonisation-phagocytose
 - ex : Ac anti récepteur de l'acetylcholine dans myasthenie, de la TSH dans l'hyperthyroïdie
- **Lymphocytes T**
 - Mécanismes : Cytotoxicité, cytokines TH1...
 - ex : Pathologies d'organes (DID, thyroïdite..)
- **Évolutivité de la réponse autoimmune**,
 - auto Ag ++++ (cibles des auto Ac et cellules T auto) depuis l'initiation jusqu'au passage à la maladie
 - Cellules effectrices et médiateurs évoluent
 - Difficulté à mettre en place une thérapeutique et rôle imprévisible des cytokines pléiotropiques à action différente selon le stade de la maladie.

EXPLORATION DES MAI

Modèles expérimentaux animaux

- de laboratoire : « knock-out » ou transgéniques
- MAI Spontanées

Exploration clinique

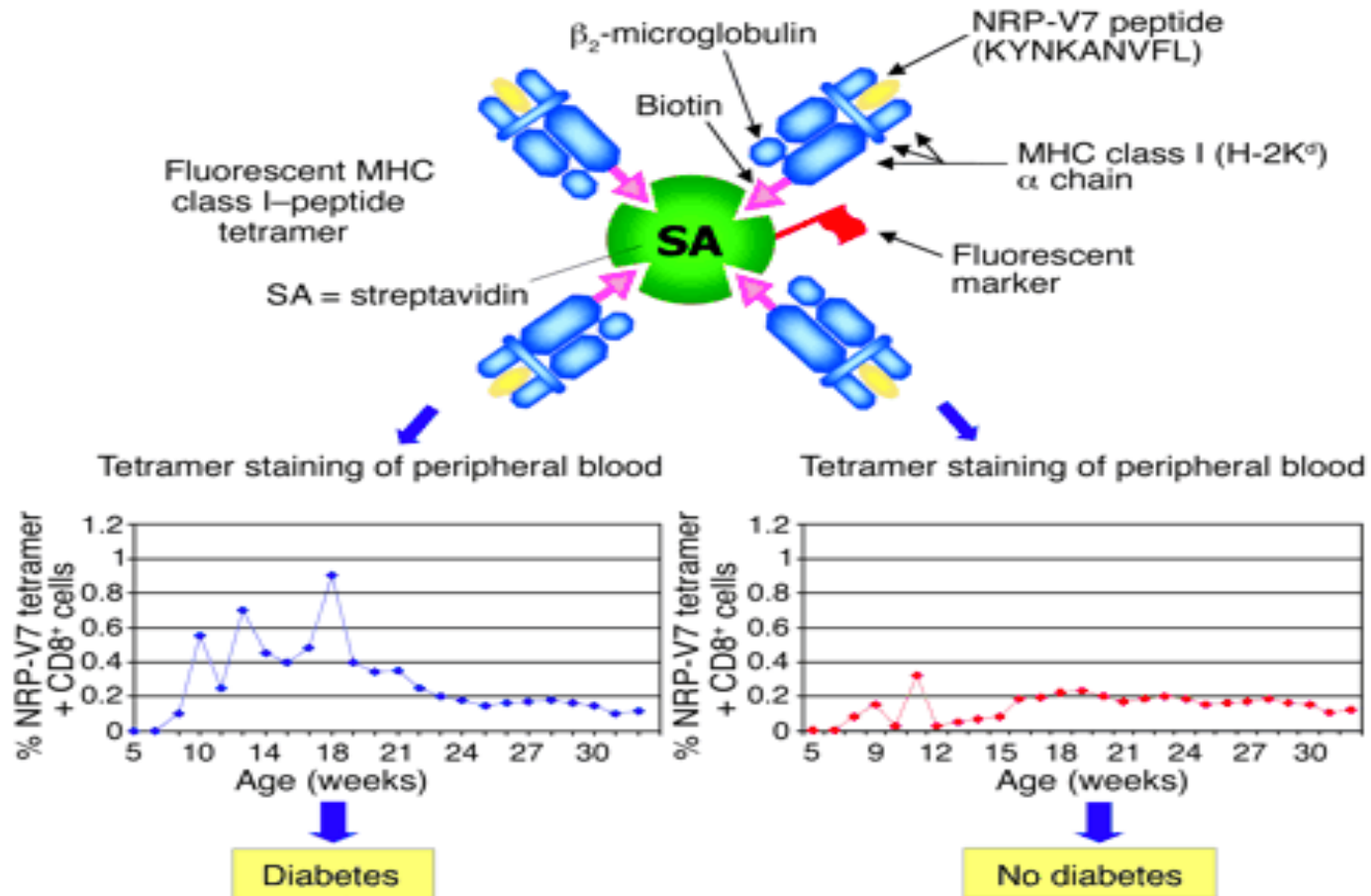
Modèles expérimentaux principaux:

Souris NOD: Non Obese Diabetes = (DID)

Diabète spontané à 3-4 semaines alors que la souche C57BL/6 est génétiquement résistante.

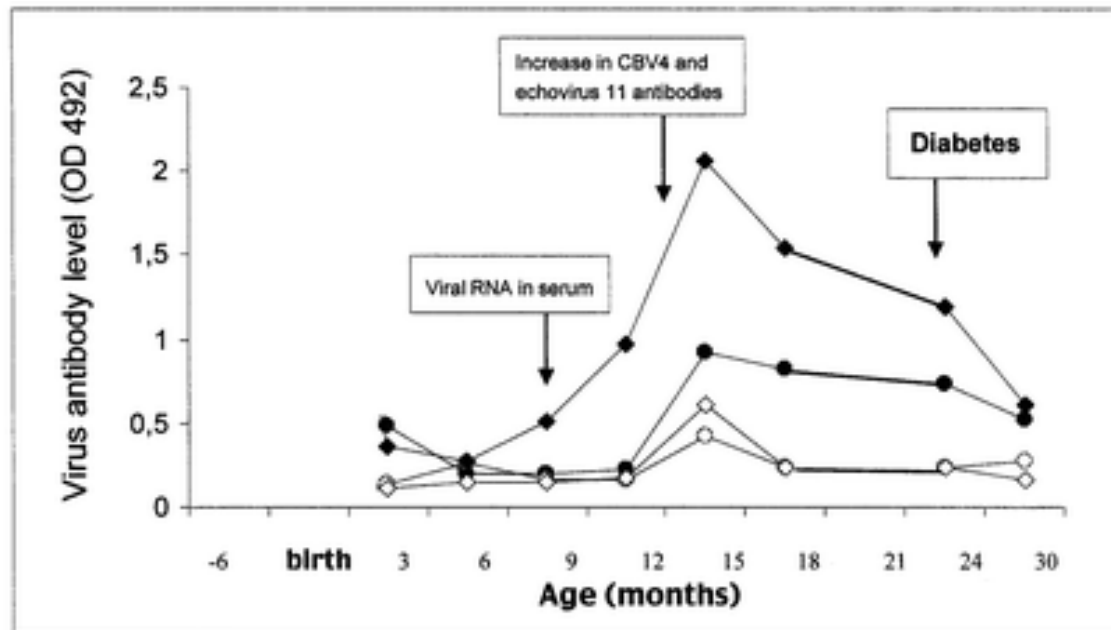
- le rôle d'IFN gamma et d'IL2 dans l'apparition de la maladie et le rôle des cellules TH1 productrices de ces cytokines dans l'induction de la maladie (expériences de transfert passif).
- l'absence de diabète chez les souris dépourvues du gène de la beta2microglobuline (associée à une absence de CD8 et de molécules MHC de classe 1) :
- la responsabilité des CD8 dans l'insulite
- le rôle des molécules co stimulatrices (B7 sur APC vs CD28 et CTLA4 sur T)
- le mimétisme moléculaire entre différents peptides (mimétisme moléculaire :
IA beta(=HLA DR) / GAD65 / proinsuline

Souris NOD : CD8 GAD 65 spécifiques / tétramères HLA classe 1



Infection virale et DID

Infection...auto Ac...Maladie



| | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ICA | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| IAA | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| GADA | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| IA-2A | - | - | - | - | - | - | + | - | + |

Encephalomyélite Aigue Expérimentale (analogue de la SEP)

Par injection de tissu nerveux.

Modèles de la Polyarthrite Rhumatoïde

Par injection de collagène type 2 à des rats

Par injection de protéoglycans / souche

Souris SKG/mutation ZAP70

Souris MLR/Ipr: Modèle du Lupus Erythémateux Disséminé (LED)

Elles ont des mutations de Fas et FasL entraînant un trouble de l'apoptose (des T et B auto réactifs sont retrouvés en périphérie, il existe une absence d'apoptose induite par l'activation). On observe un syndrome lymphoprolifératif (adénopathies +++), de nombreux autoAc et une hypergammaglobulinémie.

Souris NZB/NZW : modèle du LED

EXPLORATION CLINIQUE DES MAI

➤ le terrain génétique

surtout dans les études familiales (groupage HLA Classe I et II).

➤ **la réponse autoAc** (plus souvent conséquence de la MAI que cause et d'apparition retardée par rapport à l'évolution infra-clinique de la MAI) : **Ac anti tissulaires ou Ac anti nucléaires**

➤ La réponse cellulaire

➤ Les cytokines

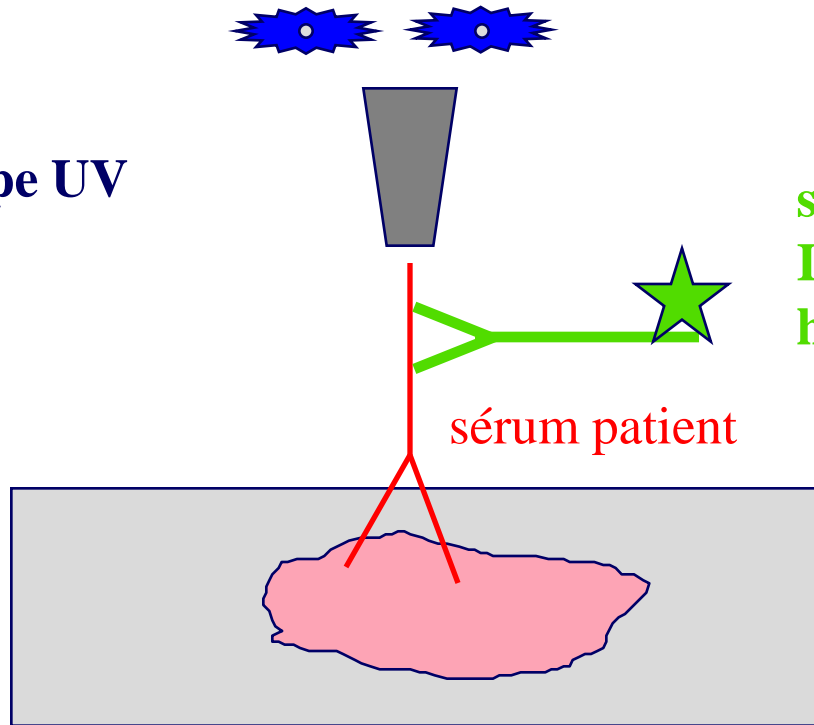
ImmunoFluorescence Indirecte

TECHNIQUE

observateur

microscope lampe UV

lame verre



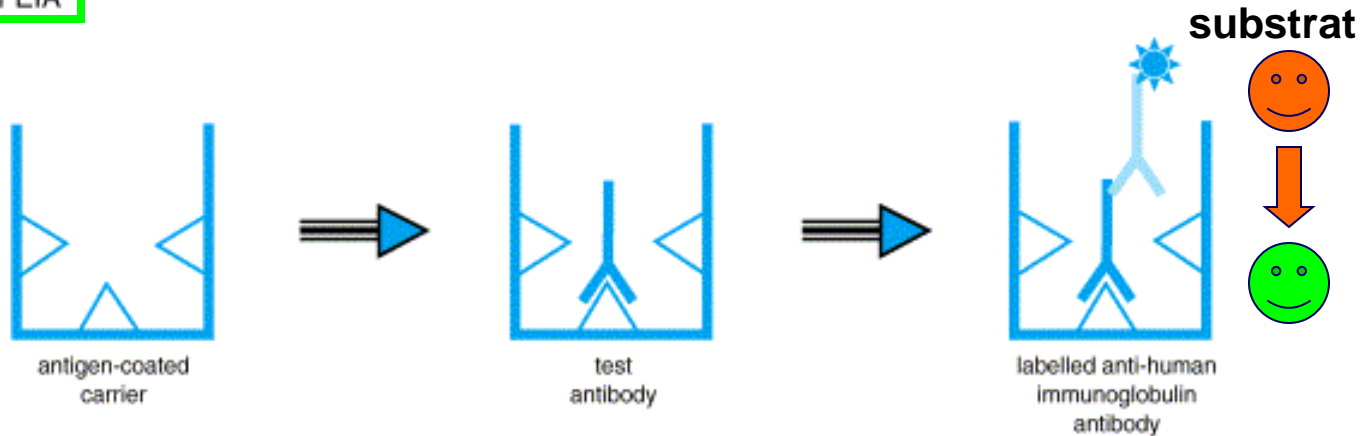
sérum animal anti-
Immunoglobulines
humaines fluorescent

tissu ou

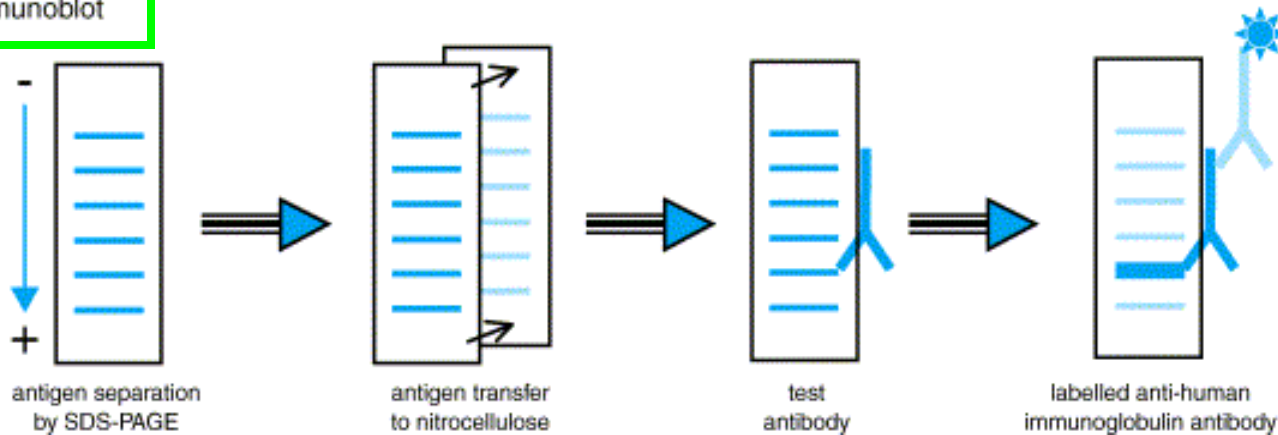
lignée cellulaire
HEp2

Techniques Immunoenzymatiques

ELISA/FEIA

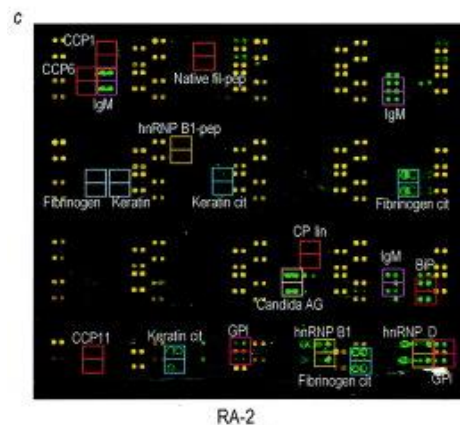
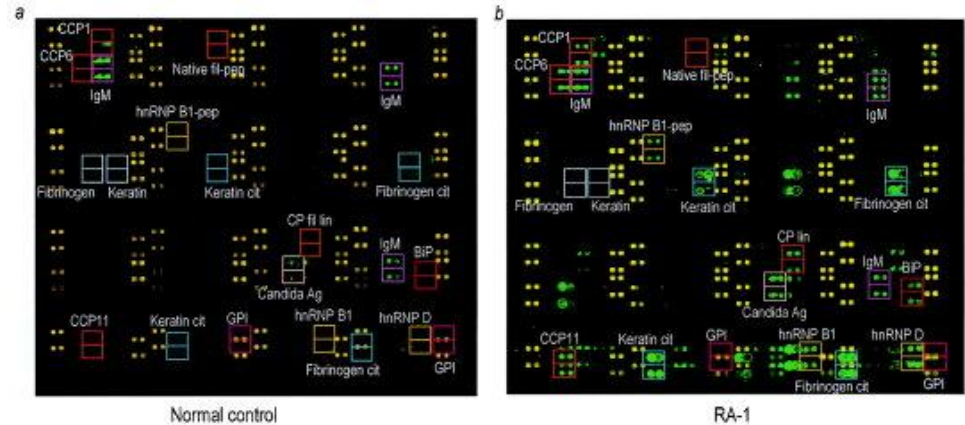


Immunoblot



Nouveaux outils pour identifier les Auto Anticorps

• Protéomique / Biopuces à auto Antigènes

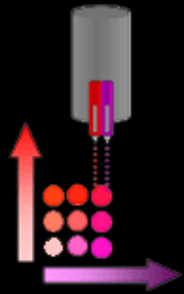


d

| Quantitative analysis of array reactivities | | | |
|---|--------|--------|--------|
| Antigen | Normal | RA-1 | RA-2 |
| CCP1 (cyc 112-15) | 10 | 4,675 | 215 |
| Native filaggrin-pep | 10 | 10 | 91 |
| CP lin (lin 0139-32) | 10 | 1,389 | 10 |
| CCP6 (Ala-6) | 264 | 3,183 | 126 |
| CCP11 (Ala-11) | 64 | 4,271 | 32 |
| BIP | 905 | 1,334 | 5,268 |
| Candida Ag | 1,308 | 3,341 | 31,809 |
| hnRNP B1 | 760 | 2,335 | 2,887 |
| hnRNP D | 855 | 4,253 | 3,316 |
| hnRNP B1-pep | 171 | 4,253 | 220 |
| GPI | 245 | 256 | 4,912 |
| Fibrinogen | 10 | 40 | 10 |
| Fibrinogen cit | 41 | 8,109 | 1,044 |
| Keratin | 20 | 14 | 77 |
| Keratin cit | 287 | 3,874 | 880 |
| IgM | 15,000 | 15,000 | 15,000 |

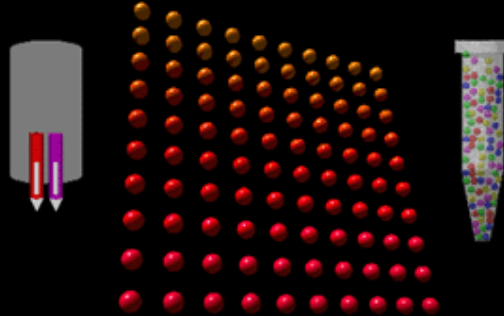
Nouveaux outils pour identifier les Anticorps

Color-coded Microspheres



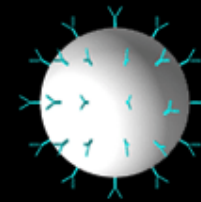
Unique microsphere sets are color-coded using a blend of different fluorescent intensities of two dyes.

100 Color-codes = 100 Simultaneous Tests



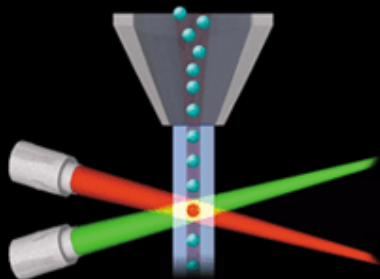
Using this method, over 100 distinct microsphere sets can be created.

Microspheres as Molecular Carriers



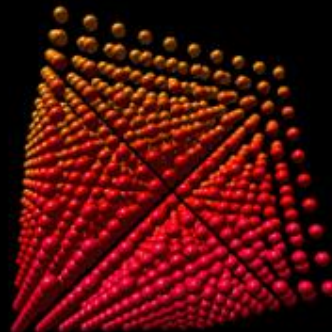
To perform a test, thousands of probes are bound to the microsphere.

Microspheres in a Fluid Stream



Precision fluidics align the microspheres in single file, and pass them through the lasers one at a time.

100 Tests Is Only The Beginning



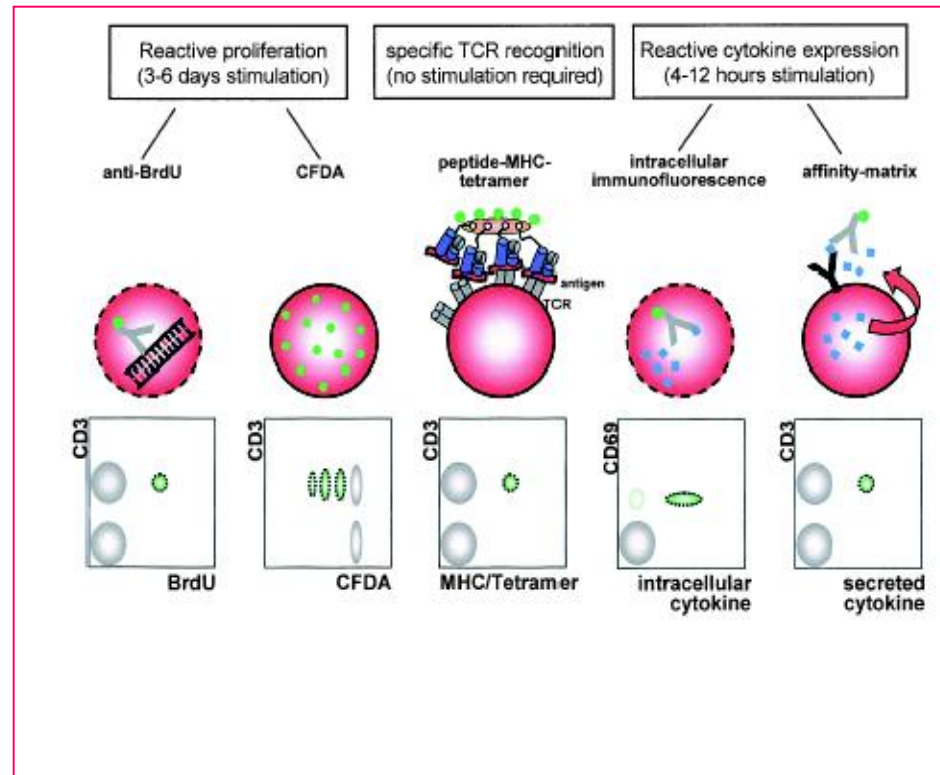
Using 3, 4, or more colors inside the microsphere increases their numbers exponentially.

Technologie MAP

ex : Luminex :
identifie plus d'une
centaine d'Ac sur un
seul test

Identifier les cellules impliquées (liquide synovial, sang...)

- **Lymphocytes T**
 - CD3, CD4, CD8,
 - Trég: CD4+25+CD27+,
Foxp3
 - Lymphocytes spécifiques auto
Ag / tétramères cl2
- **Lymphocytes B / Plasmocytes**
- **Cytokines**
 - au niveau cellulaire / cytométrie,
 - Sécrétées / Elispot* , Elisa



Des exemples de MAI

- Systémiques : Lupus, polyarthrite rhumatoïde...
- Spécifiques d'organes : M de Crohn (TD), Cirrhose biliaire primitive (cx biliaires), thyroïdite, diabète insulinodépendant, pemphigus (peau)...

LUPUS ERYTHEMATEUX DISSEMINÉ (LED-SLE*)

- Prototype des connectivites : désordre polysystémique cutané-viscéral
- **Démarche diagnostique en 2 temps : dépistage puis identification**
 - **Auto Ac anti nucléaires (IF/ HEp2)** puis :
 - **Auto Ac anti DNAn, -anti nucléosomes**, -anti nucléaires solubles **ANS** (**SSA++** chez femme enceinte > BAV fœtus) en elisa
- **Identifier les complications :**
 - **Ac anti C1q** (risque néphritique),
 - **Ac anti phospholipides-beta2GP1** (risque thrombotique)
- **TRT : Immunothérapie? Anti IL10, anti CD4OL**

LED/AutoAc anti nucléaires

➤ ETAPE 1 : Dépistage par
Immuno Fluorescence Indirecte (IFI)

sur lignée cellulaire **Hep2** :

- **Noyaux**
- **Cytoplasme**
- **Cellules en mitose**

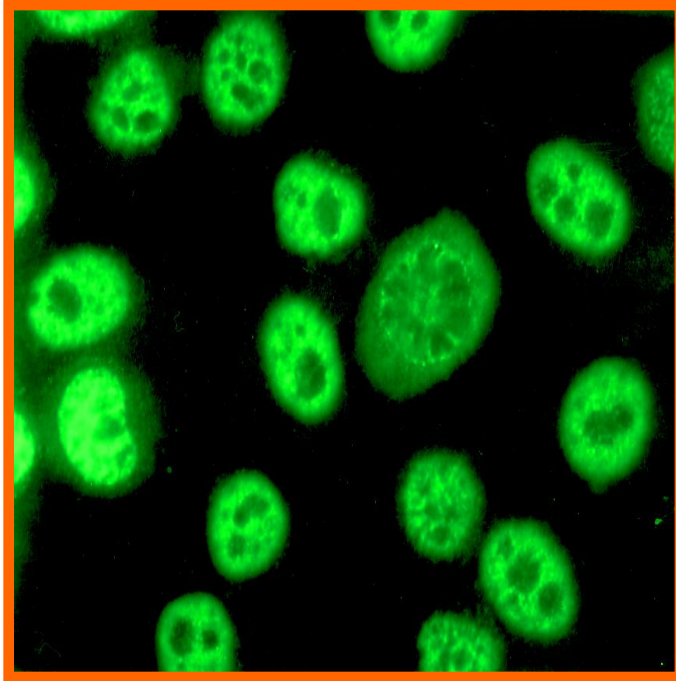
Plus de 40 aspects identifiables

Seuil de détection 1/80

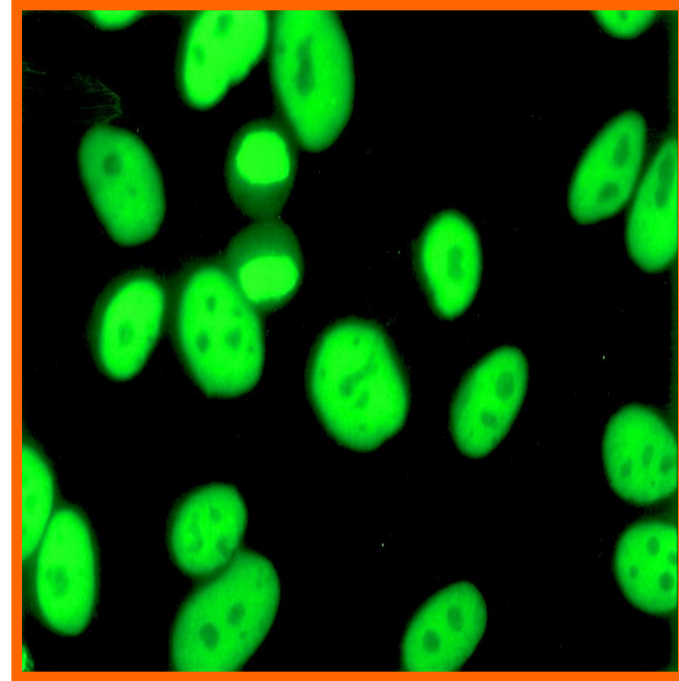
Identifie Ac de type IgG IgA et IgM.

LED

Aspect Ac anti nucléaires/HEp2

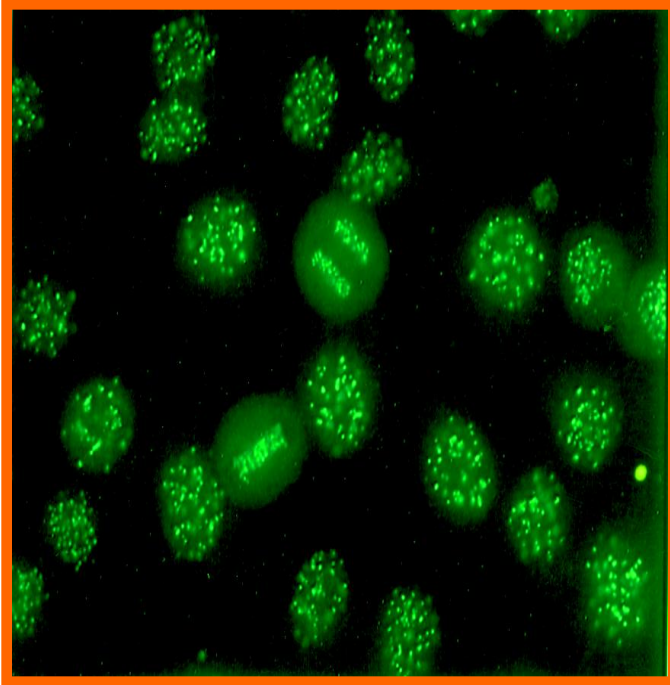


moucheté

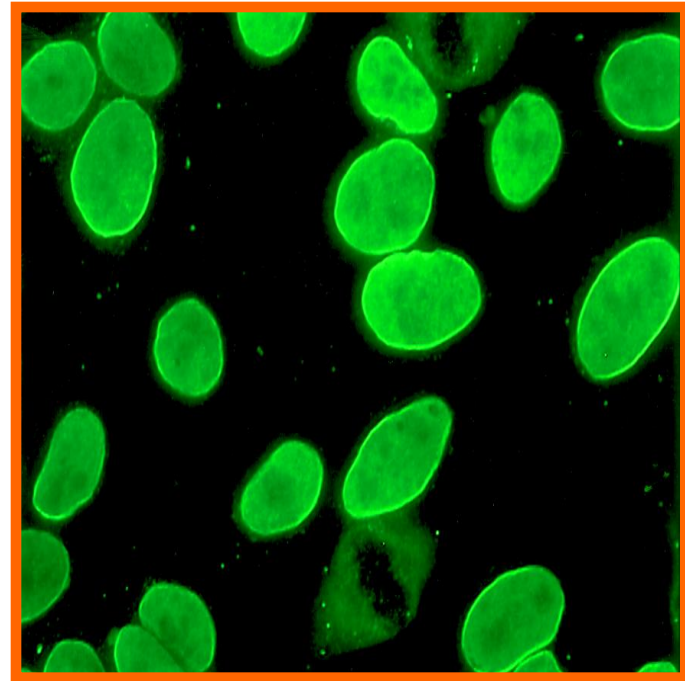


homogène

Ac anti-nucléaires/HEp2

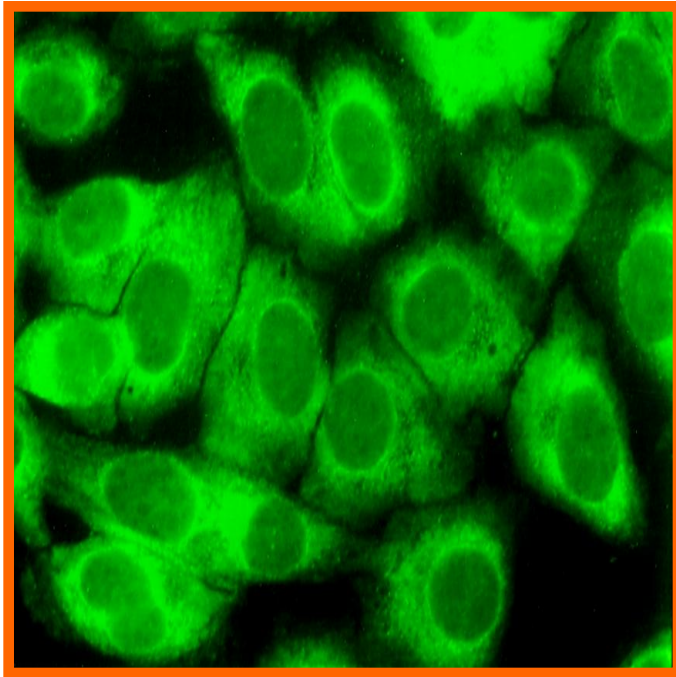


centromère

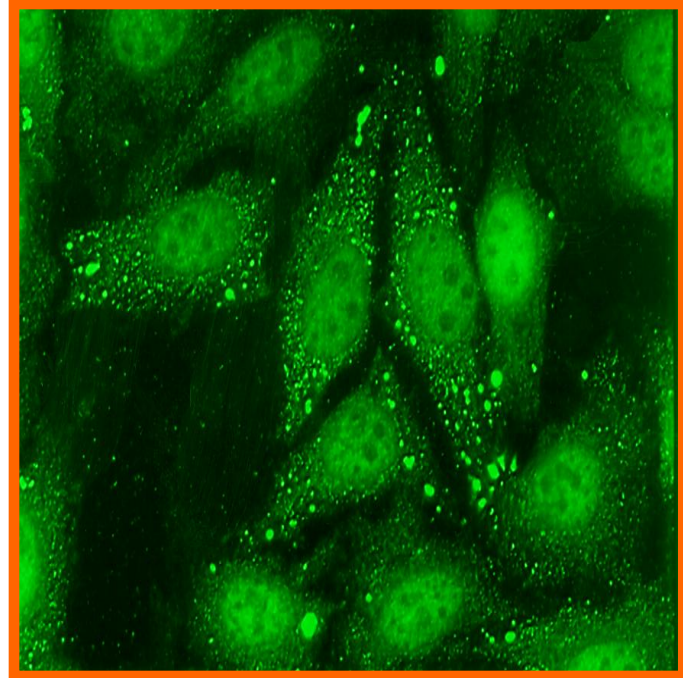


membranaire

Ac anti-nucléaires/HEp2

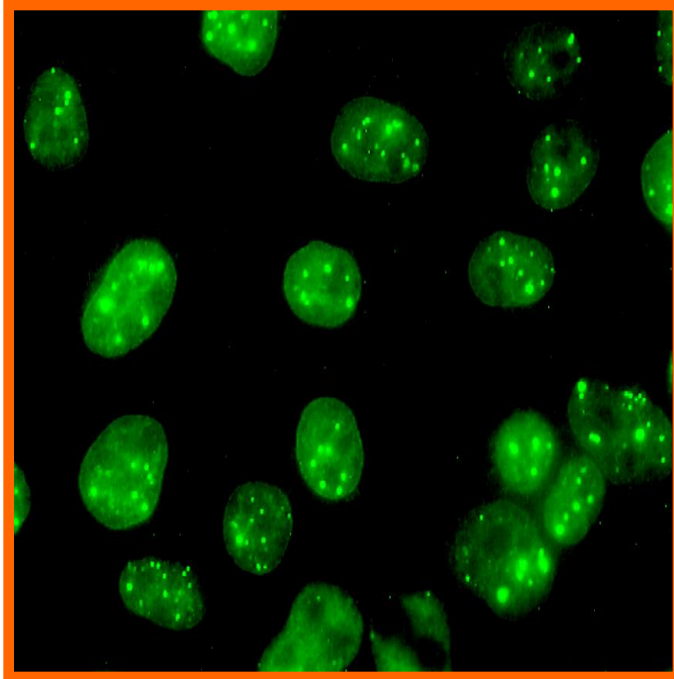


ribosomes

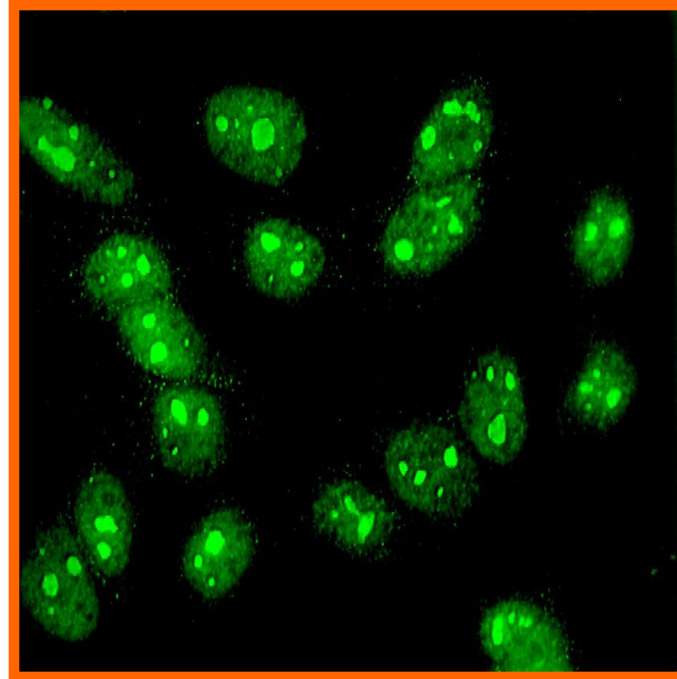


Jo-1

Ac anti-nucléaires/HEp2



dots nucléaires



nucléoles

LED/AutoAc anti nucléaires

➤ ETAPE 2 : Identification : Tests Elisa

cible Antigénique identifiée :

✓ Ac anti Ag Nucléaires Solubles :

SSA-SSB-Sm-RNP

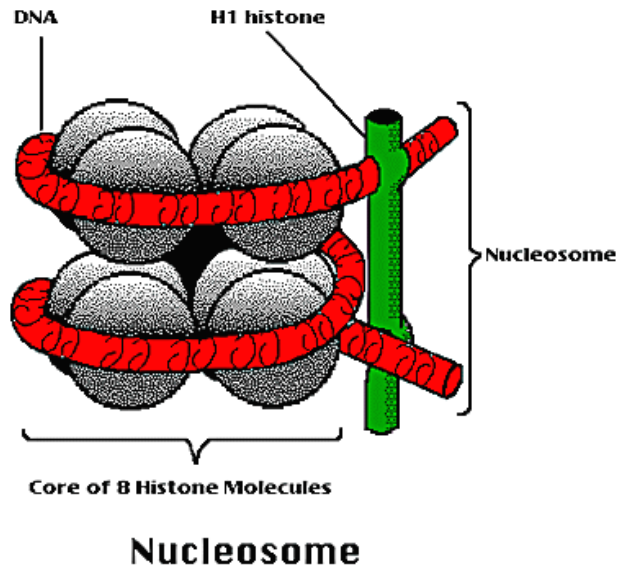
SCL70-JO1

✓ Ac anti ADN natifs quantifiés en UI

✓ Anticorps anti nucléosomes

LED

Anticorps anti Nucléosomes

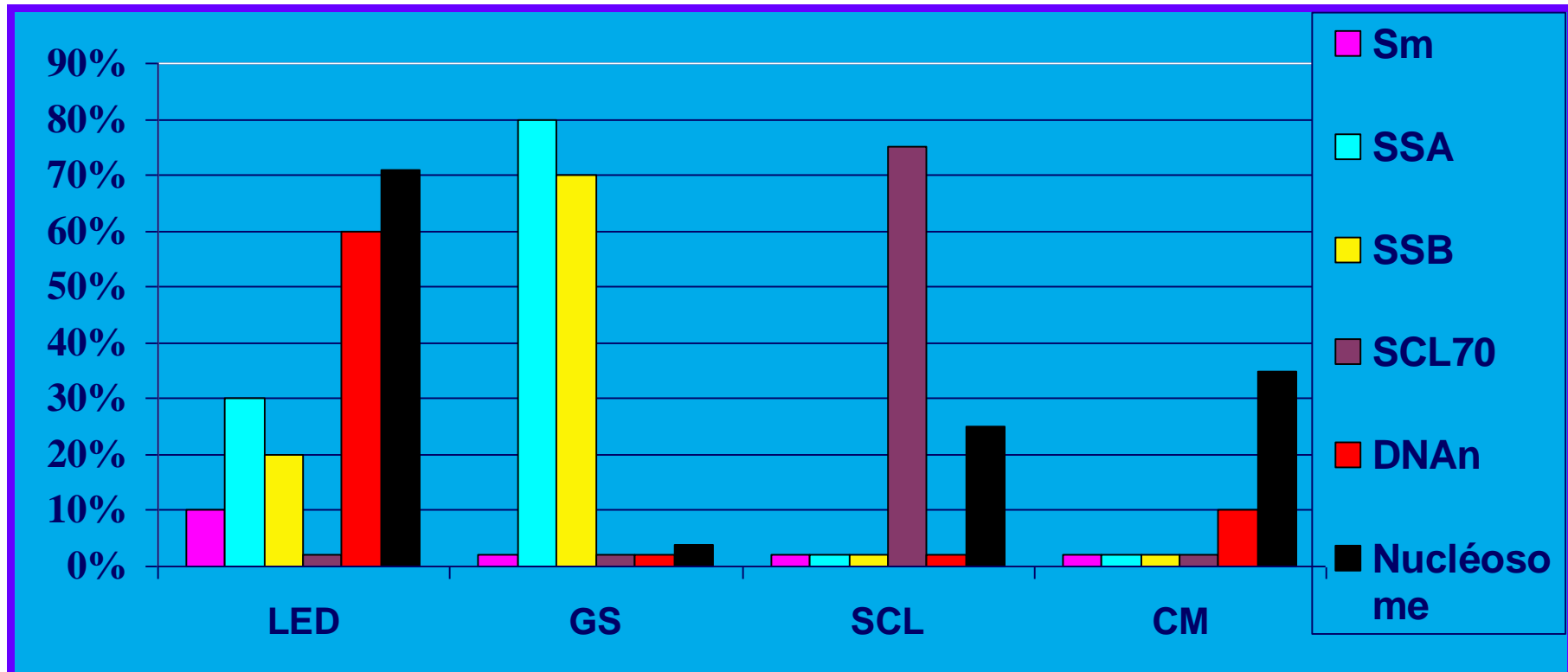


Nucléosome :

Sous unité fondamentale
de la chromatine

Dosage quantitatif en UA
dépiquant les IgG

Prévalence des différents Ac ANS selon les pathologies



Diagnostic Biologique de la CIRRHOSE BILIAIRE PRIMITIVE (CBP-PBC*)

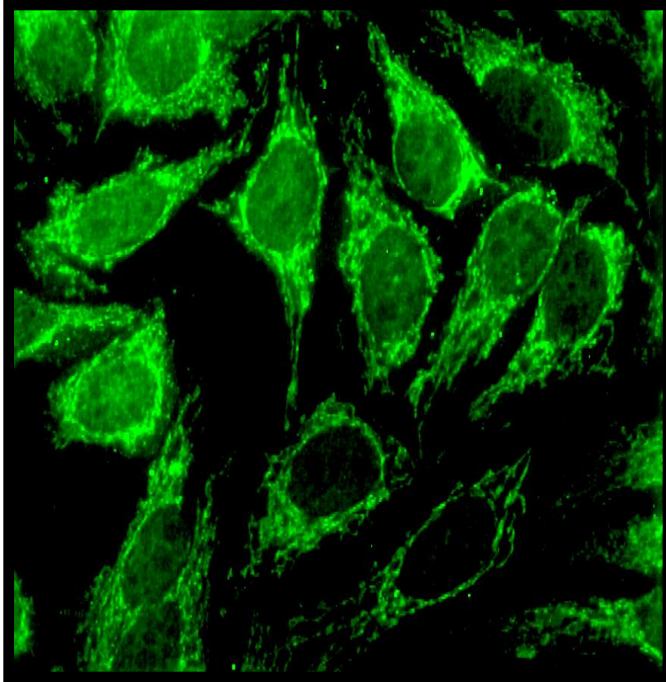
- **Destruction** des canalicules biliaires
- **Femme**, 60 ans
- **Auto Antigène** = Fraction E2 de la PDH (++ dans la membrane mitochondriale)

- **Mimétisme moléculaire** :

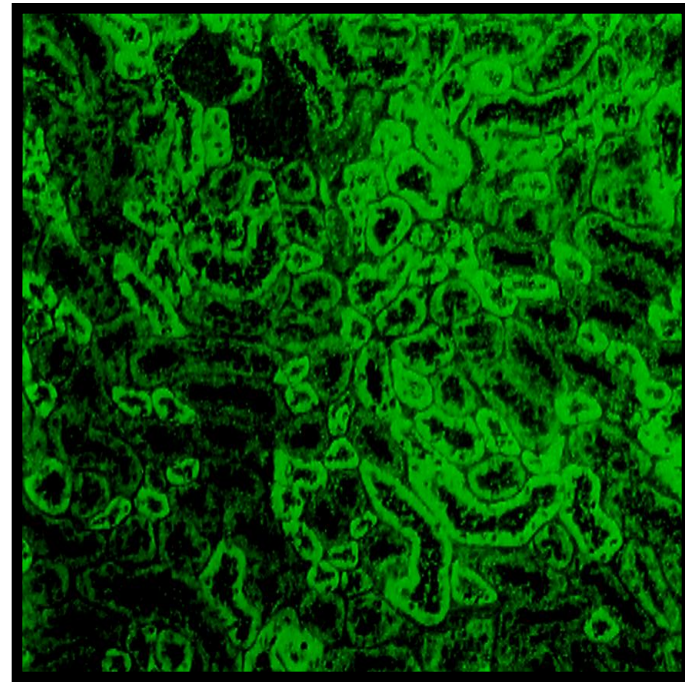
Peptide DR / PDH de E coli / PDH mitochondrial

- **Diagnostic immunologique** : Ac anti mitochondrie **M2** dans 95% des cas

Ac anti-mitochondrie M2

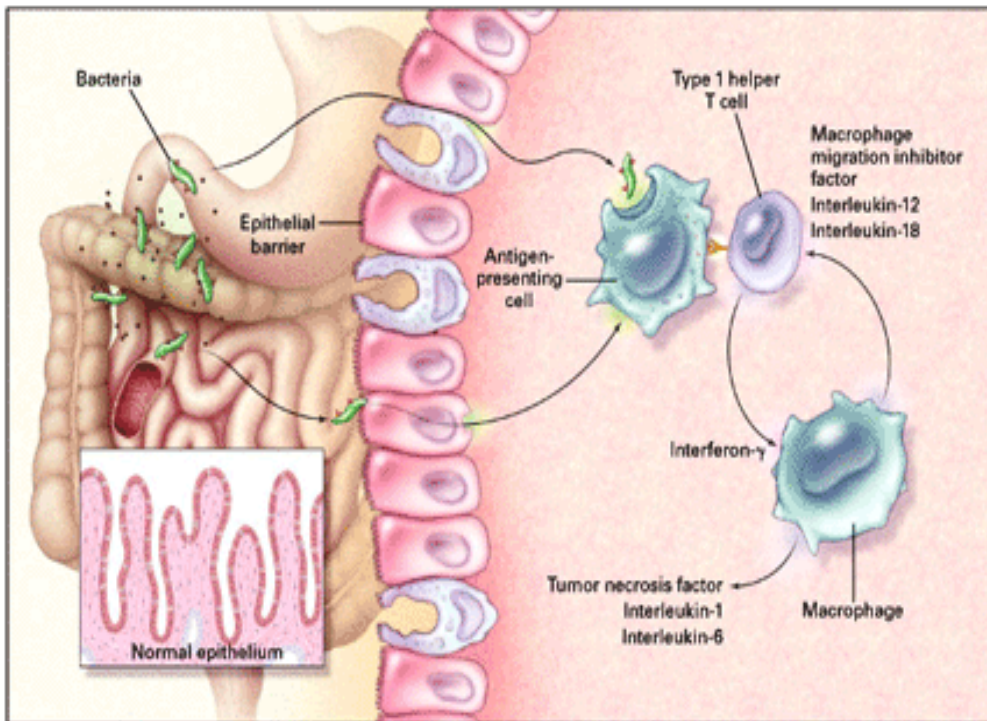


HEp2



rein de rat

MICI : M de Crohn, RCH Immunopathogénie



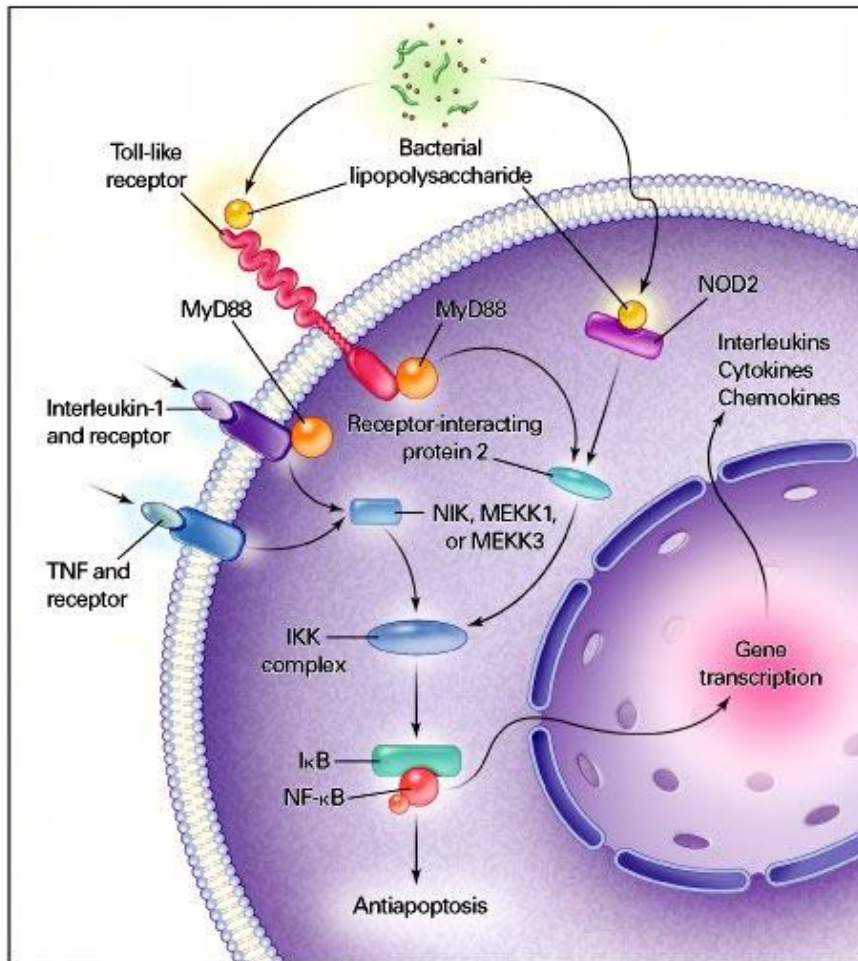
Facteurs
environnementaux

Facteurs
immunologiques

Facteurs
génétiques

MICI

Immunopathogénie



**Activation
lymphocytaire au
cours des MICI...
Production cytokines,
chemokines...
inflammation**

Anticorps MICI

ANCA/ASCA

**ANCA : Anti Neutrophil
Cytoplasmic Antibody**

**aspect atypique :
Immunofluorescence**

➤ **Cible antigénique nucléaire :
NANA**

➤ **Prévalence :**

**RCH : 30 à 80% Crohn : 10 à
20%**

CSP isolé : 25%

CSP+RCH : 60%

➤ **Intérêt diagnostique**

➤ **Intérêt pronostique**

➤ **Intérêt épidémiologique**

**ASCA : Anti Saccharomyces
Cerevisae Antibody**

• **Cible antigénique**

=mannotétraose

• **Auto Ag ? : levures du TD,
mimétisme moléculaire Ag
du Soi...**

• **Dosage quantitatif Elisa**

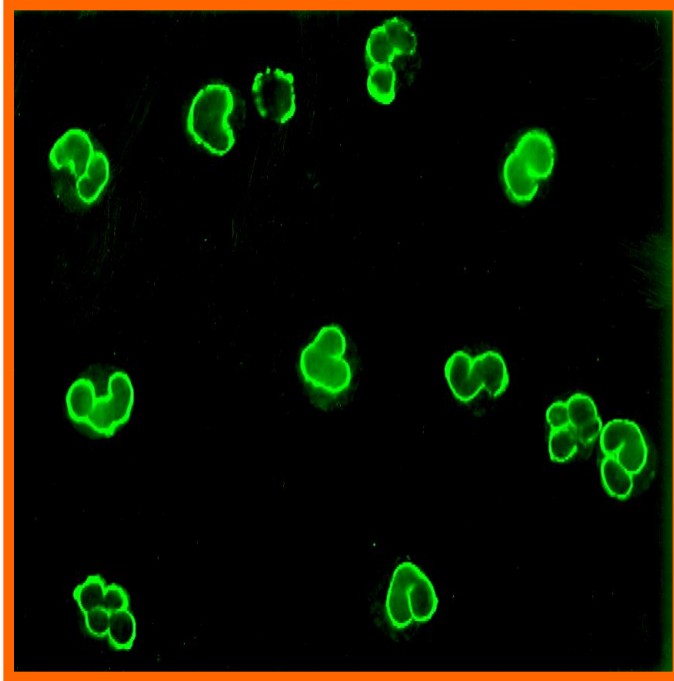
• **Intérêt diagnostique**

• **Intérêt pronostique**

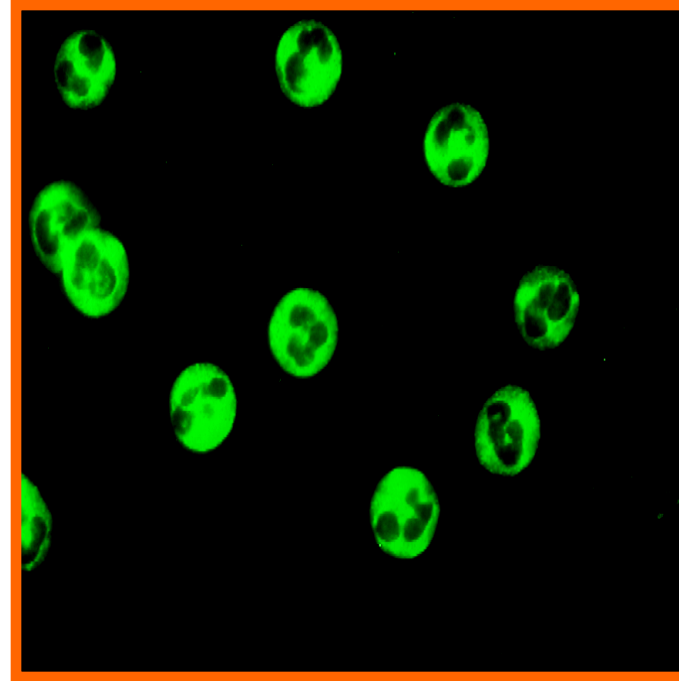
• **Intérêt épidémiologique**

ANCA

Anti neutrophil cytoplasmic Antibodies



p-anca



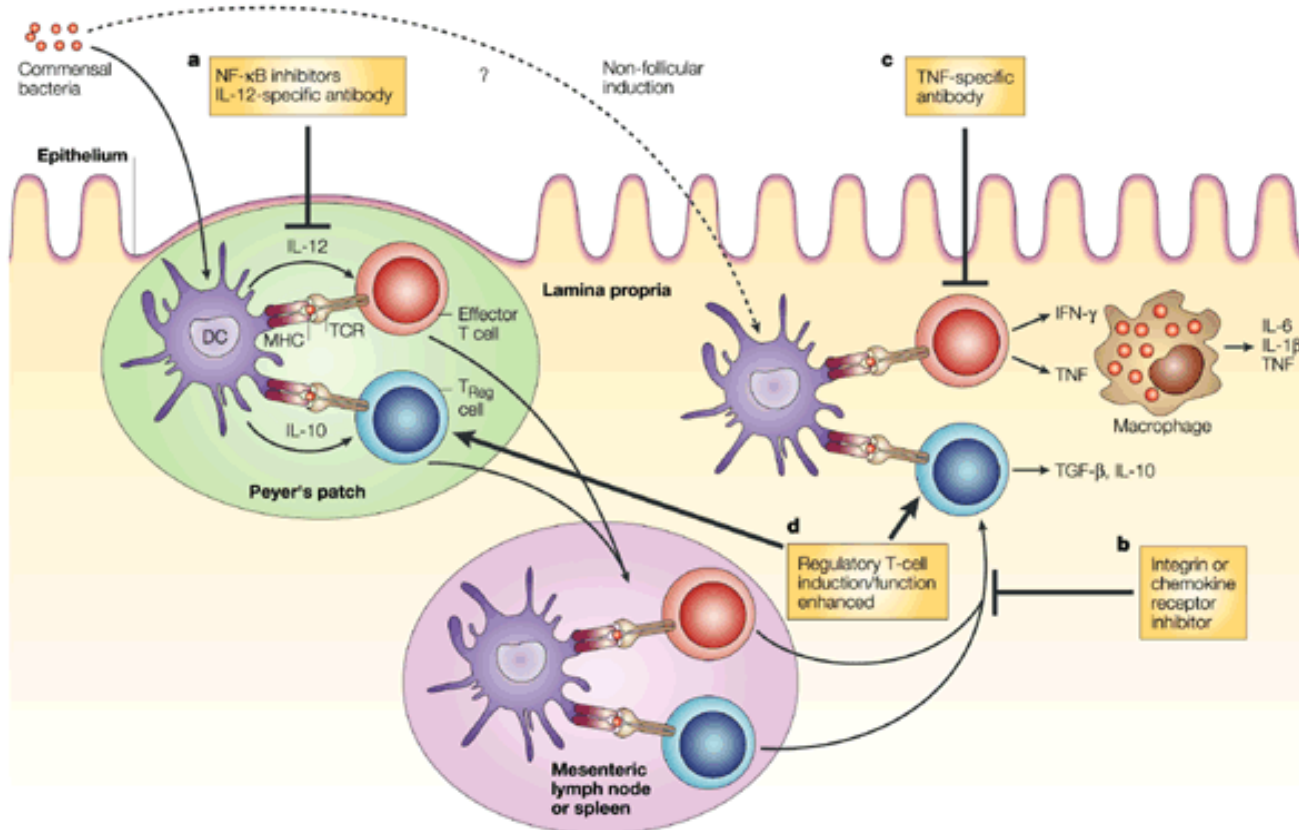
c-anca

Anticorps MICI

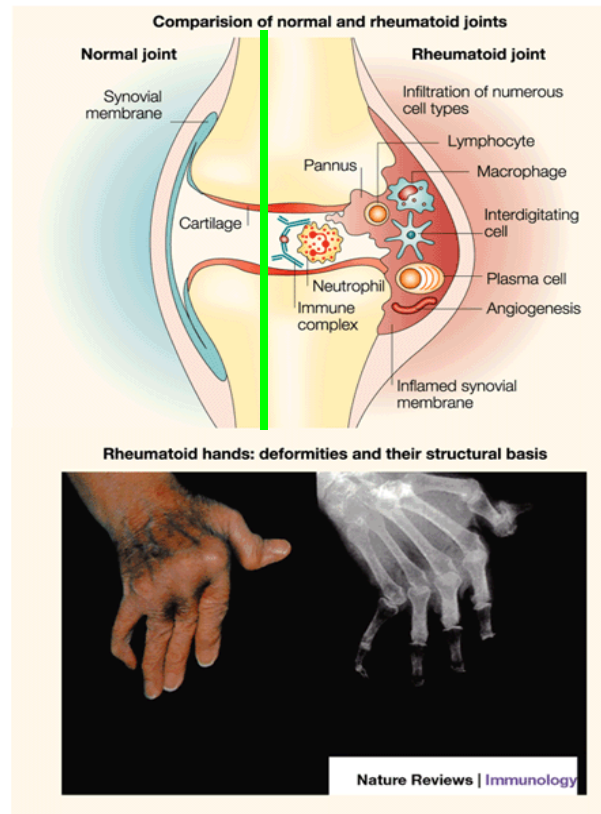
- Intérêt diagnostique de la recherche ASCA/ ANCA dans les MICI (d'après Quinton et al, 1998) :

| | RCH | Crohn | Sensibilité % | Spécificité % | VPP % |
|--------------------|------------|--------------|--------------------------|--------------------------|------------------|
| ANCA + | 66% | 15% | 65 | 85 | 74 |
| ASCA + | 12% | 61% | 61 | 88 | 89 |
| ANCA+ASCA - | 58% | 3% | 57 | 97 | 92 |
| ANCA -ASCA+ | 3% | 49% | 49 | 97 | 96 |

MICI : Cibles TRT



POLYARTHRITE RHUMATOÏDE (PR-RA*)



Lésions tissulaires (synoviale, cartilage et os) induites par infiltrat de lymphocytes T et monocytes / cytokines.

Diagnostic immunologique de la PR

✓ **Facteur Rhumatoïde** : présent chez 70% des malades = IgM anti IgG, dosage néphélométrique ou Elisa
rôle pathogène ???

✓ Ac anti nucléaires ... Négatifs ou rarement positifs

✓ Auto Ac anti Filaggrine en IF

✓ **Auto Ac anti peptides citrullinés +++++**



✓ Auto Ag identifié : glycoprotéine cartilagineuse GP39 ou chondrex

✓ HLA DRB1 0401 et 0404

✓ TRT immunosuppresseurs : antagonistes du TNF

Prévalence FR et Ac anti CCP /Age

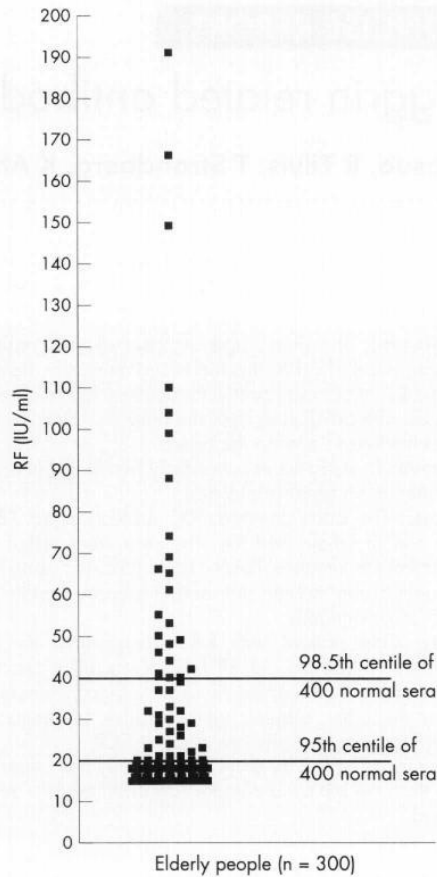


Figure 3 Occurrence of RF in sera from 300 elderly subjects. Cut off limits for positivity, at the 95th and 98.5th centiles of 400 normal human sera, determined in an earlier study,¹¹ are indicated.

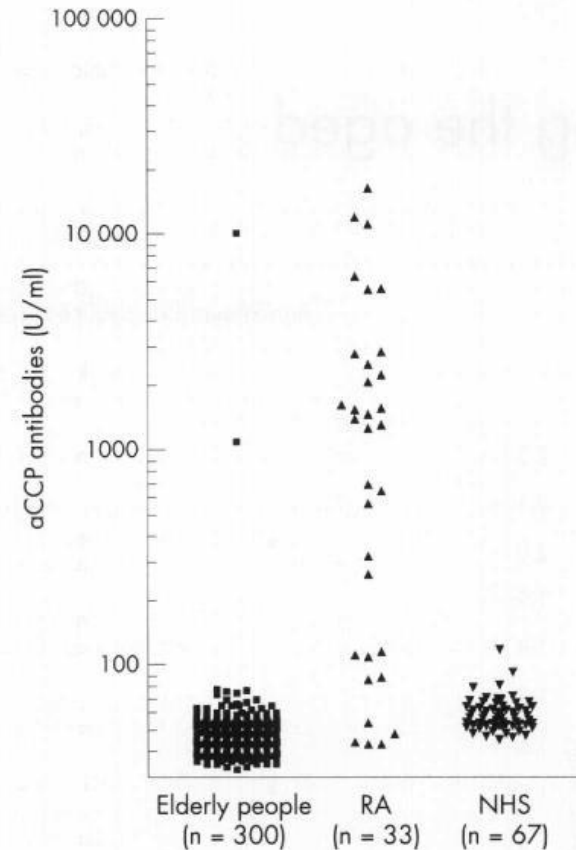
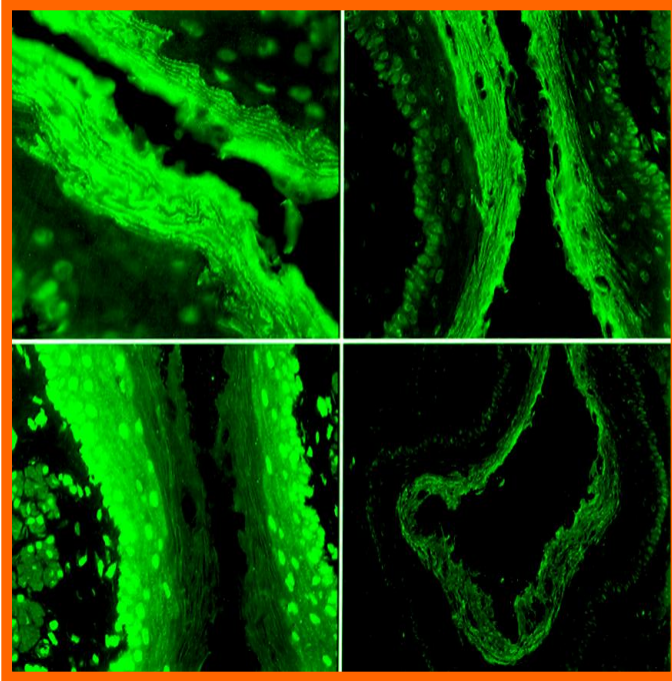
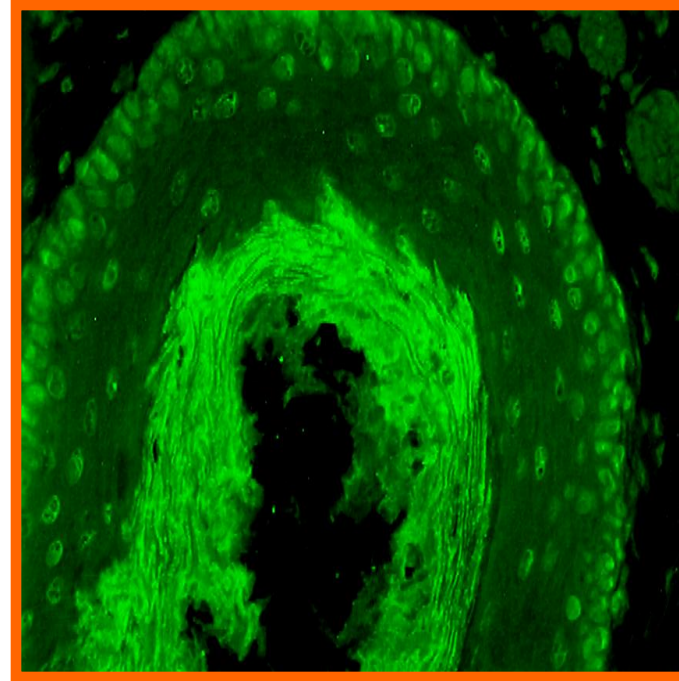


Figure 2 Distribution of IgG class antibodies to cyclic filaggrin-derived citrullinated peptide (CCP) in sera from 300 elderly people, 33 patients with RA, and 67 normal human sera.

Ac anti-Filaggrine



X 200

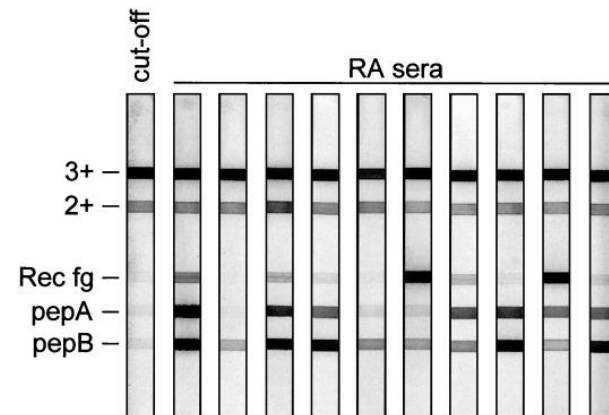


X 400

Auto Anticorps anti CCP₂

- Rôle prédictif
 - 10 ans avant symptômes
- Rôle diagnostique

| SSté% | SPé% | VPP% | VPN% |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 83 | 95 | 93 | 87 |
- Rôle pronostic
- Evolution / Suivi
Traitement ---



Nouvelles Cibles Trt PR

- Physiopathogéniques?
- Diagnostiques ?
- Thérapeutiques ?
 - Cellules
 - Cytokines
 - Molécules signalisation

