

# Valeur de l'immunomarquage C5b9 dans le diagnostic d'hémochromatose néonatale par mécanisme allo-immun

**Journée SOFFOET 4/12/15**

Estelle Dubruc, interne Hospices Civils de Lyon

Dr Sophie Collardeau-Frachon, MCU-PH, Centre de Pathologie Est, Bron



*Hospices de Lyon*

 **SoFFoet**  
Société Française de Fœtopathologie

## HNAI

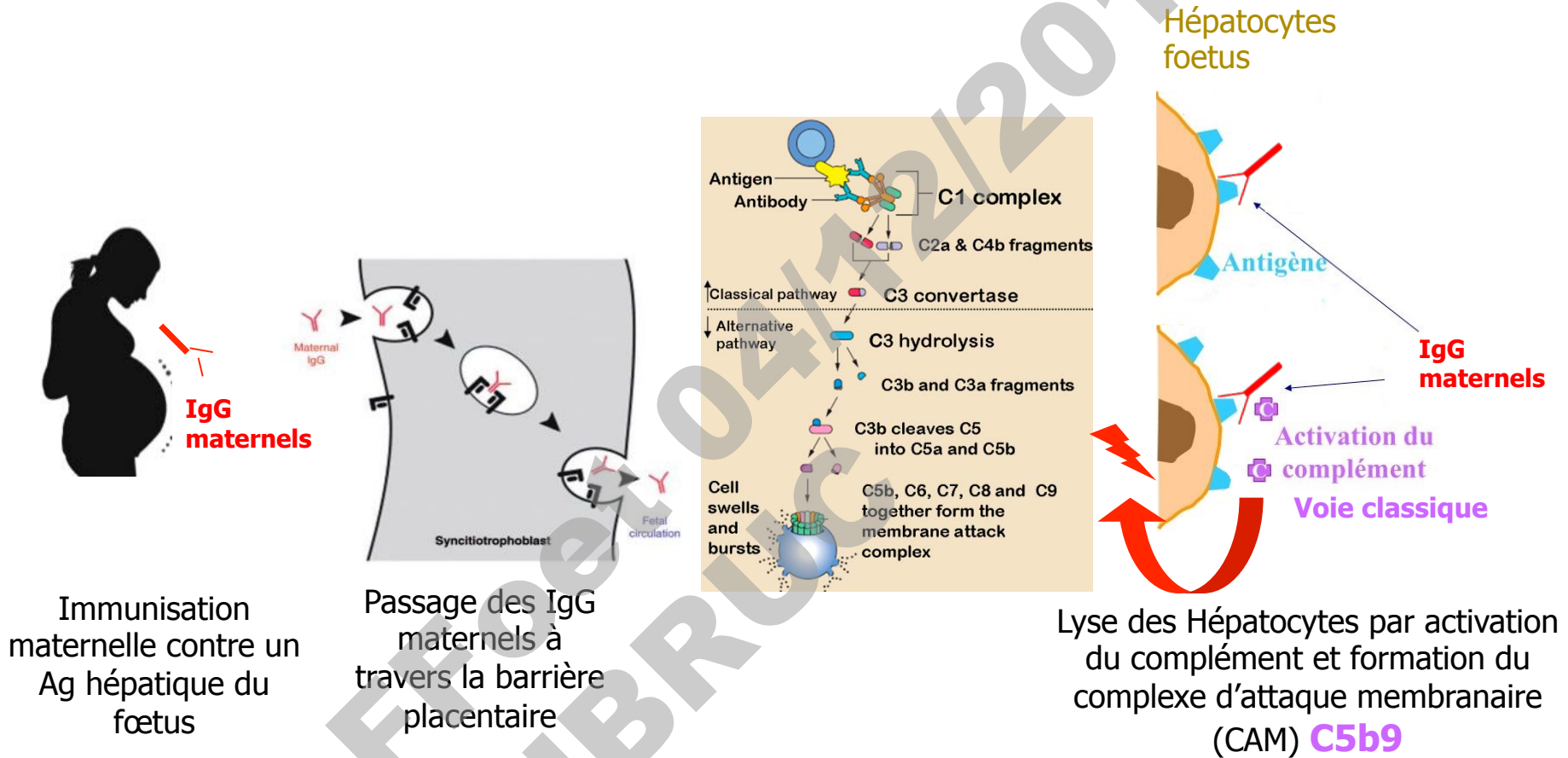
- **Travaux de P.Whittington et al (Chicago)**
- **Hypothèse basée sur:**
  - Absence d'argument pour une maladie héréditaire
  - Taux de récurrence intrafamiliale 80%
  - Transmission d'origine maternelle

### **récurrence chez des demi-frères ou demi-sœurs issus de la même mère**

- Efficacité du traitement des grossesses à risques par des immunoglobulines intraveineuses (IgIV)

*Whittington PF, Malladi P. Neonatal hemochromatosis: is it an alloimmune disease? J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005;40:544-49.*

# Hypothèse physiopathologique

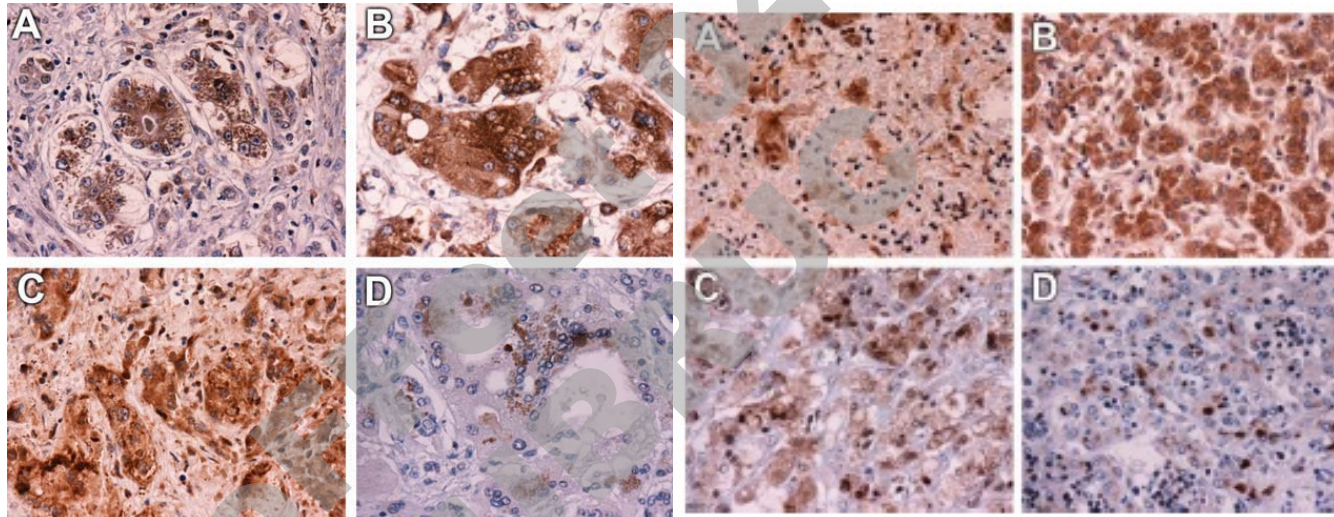


Nature de l'Ag Foetal ?

- **Expression du C5b9 au niveau des hépatocytes: spécifique de l'HNAI**

- 2 études de l'équipe de Whittington:

- *Pan X, Kelly S, Melin-Aldana H, Malladi P, Whittington PF. Novel mechanism of fetal hepatocyte injury in congenital alloimmune hepatitis involves the terminal complement cascade. Hepatology 2010;51:2061-68.*
- *Whittington PF, Pan X, Kelly S, Melin-Aldana H, Malladi P. Gestational alloimmune liver disease in cases of fetal death. J Pediatr. 2011 Oct;159(4):612-6.*

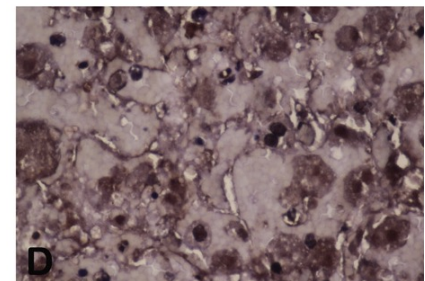
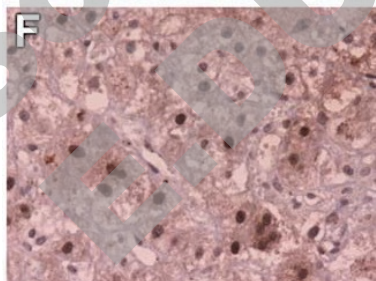


HNAI

->Aspect du marquage?  
->Influence de la surcharge en fer?

HSV

Spécificité ?



# Immunohistochimie C5b9

## 2 études: 41 cas HNAI avec >75% de parenchyme hépatique avec expression anti-C5b9

- Pan X, Kelly S, Melin-Aldana H, Malladi P, Whittington PF. Novel mechanism of fetal hepatocyte injury in congenital alloimmune hepatitis involves the terminal complement cascade. *Hepatology* 2010;51:2061-68

33 cas HNAI (27 autopsies and 6 transplants hépatiques)

### Phénotype HN non AI : 37 (31 biopsies hépatiques)

- 13 atrésie des VB
- 3 PFIC1
- 3 PFIC2
- 3 déficit en D4-oxosteroïd réductase
- 3 cas avec alimentation parentérale totale avec cholestase après résection colique.
- 3 Syndrome d' Alagille
- 2 déficit en alpha-1-antitrypsin (génotype PiZZ)
- 2 tyrosinémie type 1
- 1 abétalipoprotéinémie
- 1 CDG1a
- 1 syndrome de rétention biliaire après chirurgie cardiaque
- 1 syndrome tricho-hépto-enterique
- 1 HSV1

10.8% à 12.5% (range 0%-45%) des hépatocytes positifs pour C5b9

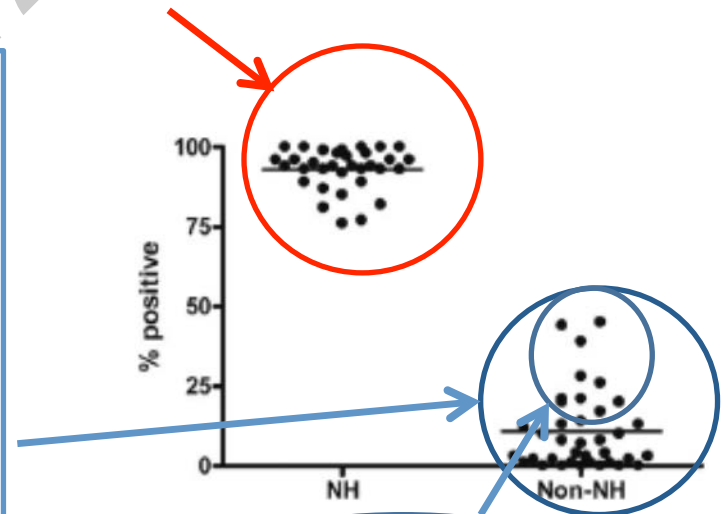


Fig. 6. Expression of C5b9 in hepatocytes determined from immunohistochemical studies. The results are shown as the percentage of positive hepatocytes. NH, non-hepatocellular injury; Non-NH, non-hepatocellular injury.

9 cas dans le 1er quartile:  
3 PFIC1, 1 D4-3oxo, 1 Alagille, 1 tyrosinémie, 1 syndrome tricho-hépto-enterique, 2 atrésie des VB

## Immunohistochimie C5b9

Whittington PF, Pan X, Kelly S, Melin-Aldana H, Malladi P. Gestational alloimmune liver disease in cases of fetal death. *J Pediatr.* 2011 Oct;159(4):612–6: **8 cas**

**Table I.** Cases: Clinical characteristics and liver immunohistochemistry

Case	Gestational age, weeks	Birth status	Sibling with NH	Extrahepatic siderosis	C5b-9 staining
1	22	Live birth	Yes	No	4+
2	22	Stillbirth	No	No	4+
3	34	Stillbirth	No	Yes	4+
4	30	Live birth	Yes	Yes	4+
5	22	Stillbirth	No	Yes	4+
6	20	Stillbirth	No	Yes	4+
7	20	Stillbirth	No	No	4+
8	21	Stillbirth	No	Yes	4+

**1+ = <25%, 2+ = 25%-50%, 3+ = 50%-75%, 4+ = >75% hépatocytes positifs**

**Table II.** ALF case controls: Clinical characteristics and liver immunohistochemistry

Case control	Age at death	Autopsy diagnosis	C5b-9 staining
CC-1	12 days	HSV acute hepatic necrosis	1+
CC-2	9 days	Echovirus liver necrosis	1+
CC-3	3 months	Adenovirus ALF	1+
CC-4	12 days	Enterovirus hepatic necrosis	2+
CC-5	9 days	HSV acute hepatic necrosis	1+
CC-6	13 days	HSV acute hepatic necrosis	1+
CC-7	1 day	Ischemic hepatic necrosis	1+
CC-8	0 days	Maternal HELLP syndrome	1+

## Valeur de l'immunomarquage **C5b9** dans le diagnostic de l'HNAI

- Confirmation des données de Whittington?
- si C5b9 spécifique de HNAI: outil de diagnostic facile à utiliser: rapide, peu coûteux
- **Enjeux thérapeutiques: Ig IV :**
  - effets secondaires
  - coût

## Méthode

- Étude immunohistochimique rétrospective multicentrique
- anti-C5b9 and anti-C4d
- 4 groupes:
  - 1: HNAI : 20/32 cas (examinés à ce jour)
  - 2: HN non allo-immune : 25/45 cas (examinés à ce jour)
  - 3: Hépatopathies sans surcharge en fer: 15 cas
  - 4: contrôles : 5 cas



# Résultats : immunohistochimie C5b9

**Groupe 2: HN non allo-immune : 25/45 cas**

- 2/5 parvo: 5%
- 3/5 CMV: <5%
- 2 HSV1: 90%
- 1/2 HSV2: 80%
- 1 /2 Entérovirus:90%
- 1/3 DGUOK: 80%
- 3/3 Allo-imm anti GR : 80%
- 2/2 T18 < 5%
- 1/3 T21: 90%
- 3/5 cardiopathie : 5%
- 1Taldo : 20%
- 1D4-3oxo: 90%
- 2: leucémie<5%
- 1 GRACILE<5%
- 2/3 FLH<5%
- 1CDA I
- 1 Martinez-Frias
- 1CDG1a
- 2 E coli

*anti-C5b9 neoantigen, Quidel, San Diego, CA  
dilution: 1/150*

**Groupe 1: 20/32 cas HNAI**  
**Exprimé dans tous les cas mais :**  
**>75% in 40%**  
**<75% in 60%**  
**Moyenne: 64%**

**Groupe 3: hépatopathies sans surcharge en fer : 15 cas**

- 2 hépatites à cellules géantes avec anémie auto-immune: 90%
- 1 Gaucher : 80%
- 2 atrésie des voies biliaires: 0%
- 2 Alagille: 0%
- 1 A1AT: 0%
- 2 PFIC1: 20%
- 2 PFIC2:0%
- 2 Tyrosinémie: 0%
- 1 mucoviscidose: 75%

**Groupe 4: 5 cas**  
**Contrôles**  
**4 foetus**  
14 SA  
22 SA  
25 SA  
27 SA  
**1 nouveau né**  
38 SA + 4 j

# Immunohistochimie C5b9

## Phénotype HN non HNAI : cas

- 2/5 parvo: 5%
- 4 / 4 CMV: <5%
- 2 HSV1: 90%
- 1/2 HSV2: 80%
- 1 /2 Entérovirus: 90%
- 1/3 DGUOK: 80%
- 3/3 Allo-imm anti GR: 80%
- 2/2 T18 < 5%
- 1/3 T21: 90%
- 3/5 cardiopathie: 5%
- 1 Transaldolase : 20%
- 1 D4-3oxo: 90%
- 2 leucémie: <5%
- 1 GRACILE: <5%
  
- 4/6 Cytop. Mito: 38%
- 1 Anémie Cong dysérythropoïétique : 20%
- 1 lupus néonatal : 0
- 1 Martinez-Frias ??
- 1 CDG1a : ? Necker
- 2 FLH : ? MFabre
- 1 E coli : ? MFabre

## 36 cas HNAI

C5b9 sur 20 cas (blocs disponibles):  
*anti-C5b9 neoantigen, Quidel, San Diego, CA*  
*dilution: 1/150*

Exprimé dans tous les cas mais :

>75% in 40%

<75% in 60%

**Moyenne : 62%**

## Cas non HNAI sans surcharge en fer : 14 cas

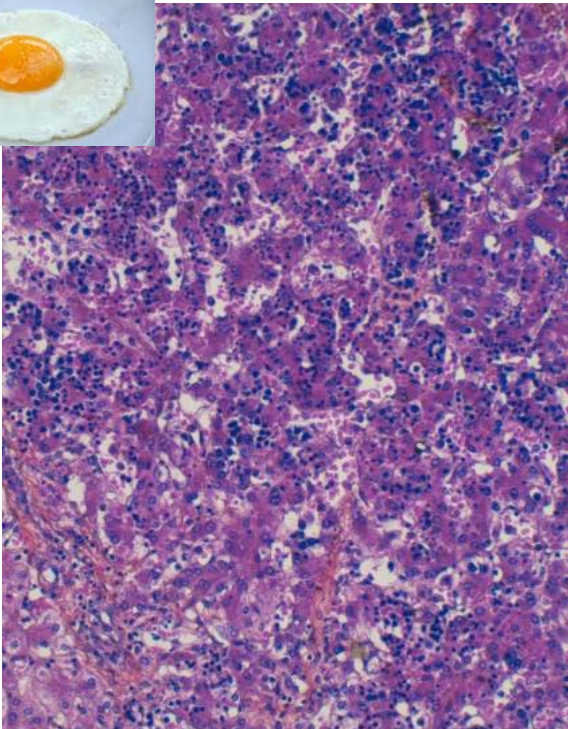
- 1 hépatite à cellules géantes avec anémie hémolytique auto-immune : 90%
- 1 Gaucher : 80%
- 3 Atrésie des VB: 0%
- 2 Alagille: 0%
- 1 A1AT: 0%
- 1 PFIC1: 20%
- 2 PFIC2: 0%
- 2 Tyrosinémie: 0%
- 1 abéta lipoprotidémie : 0%

*Relevance of C5b9 immunostaining in the diagnosis of neonatal hemochromatosis : a retrospective multicenter study.*

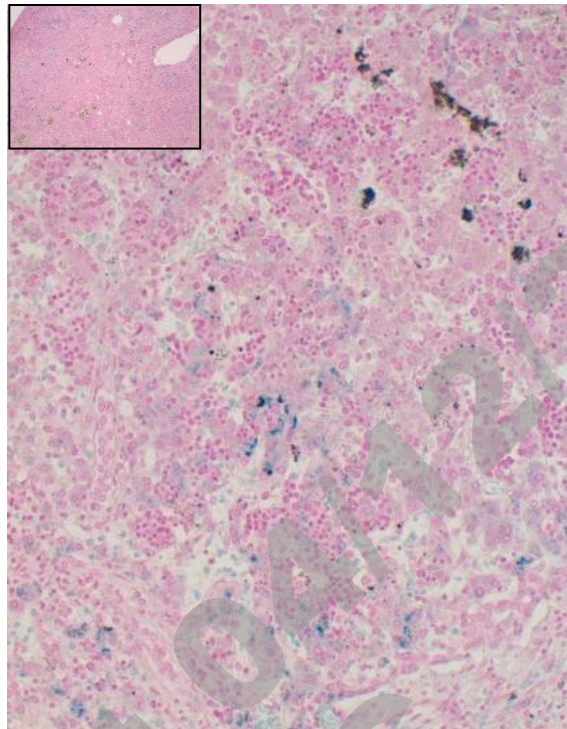
*Estelle Dubruc, Beatrice Nadaud, Sophie Collardeau-Frachon.*

Cas HNAI

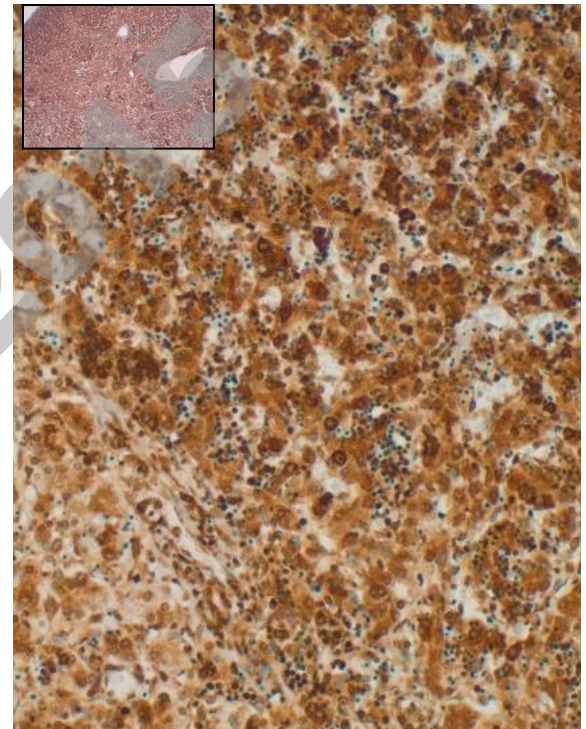
Cas control même âge



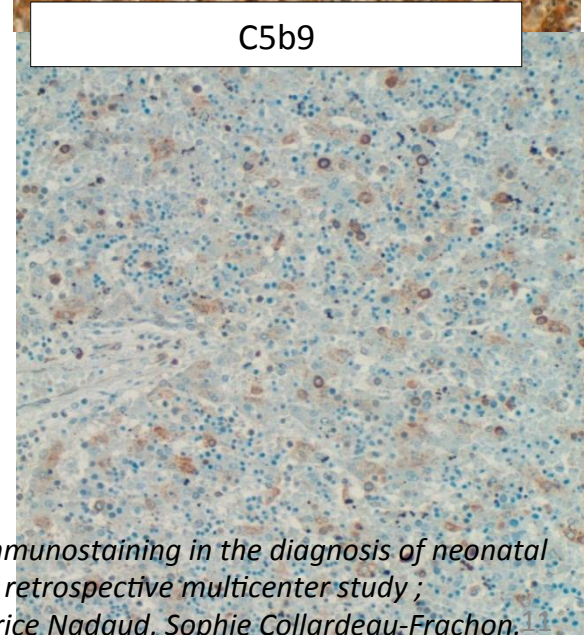
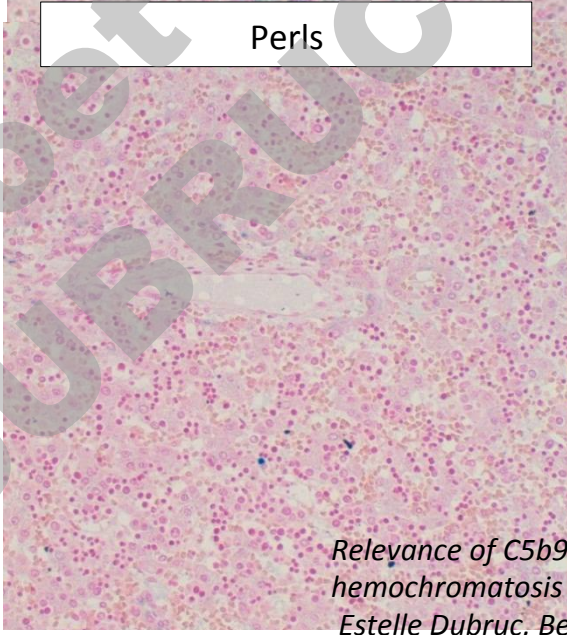
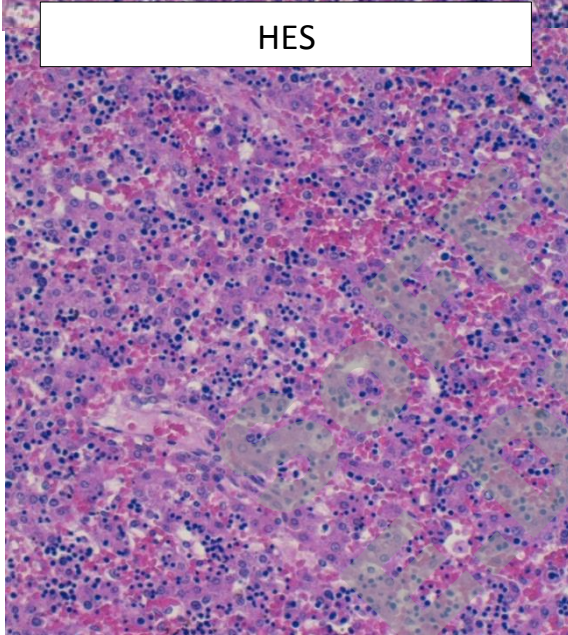
HES



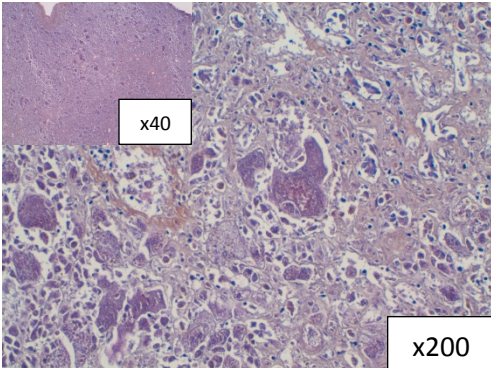
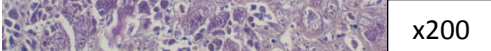
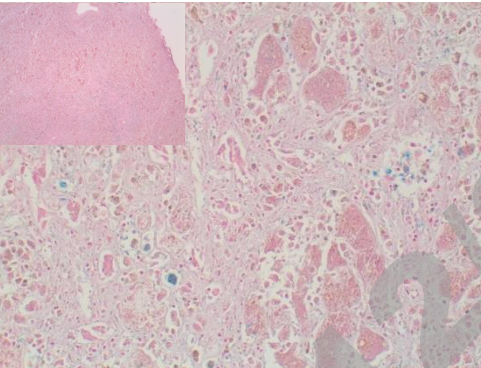
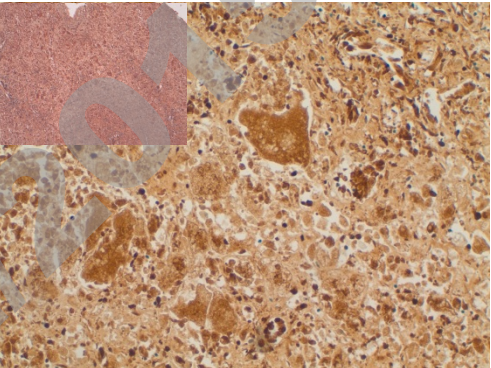
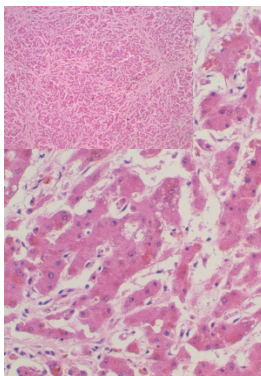
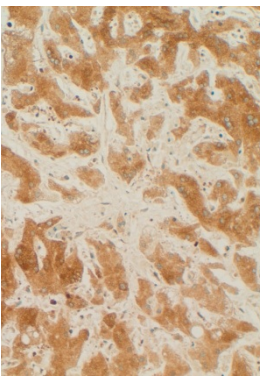
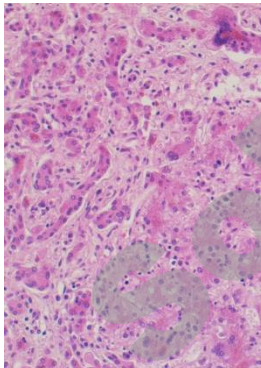
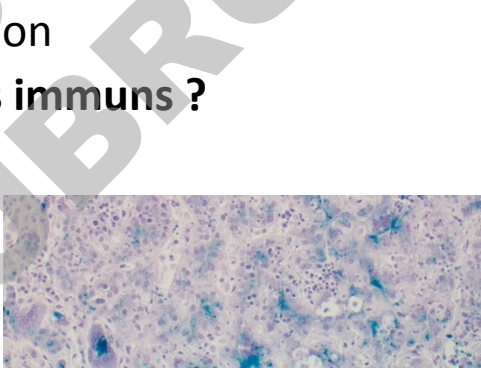
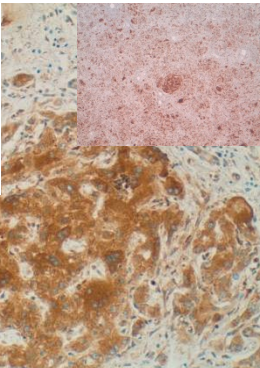
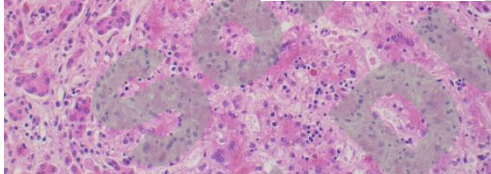
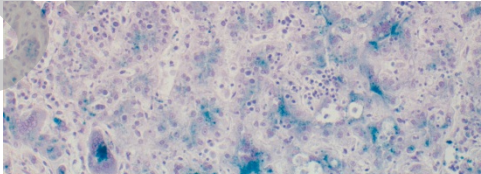
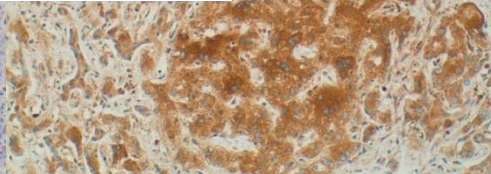
Perls



C5b9

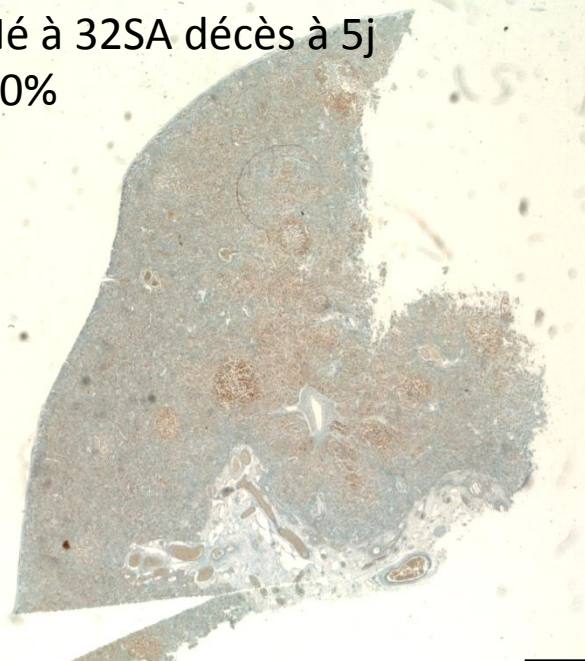


Relevance of C5b9 immunostaining in the diagnosis of neonatal hemochromatosis : a retrospective multicenter study ;  
Estelle Dubruc, Beatrice Nadaud, Sophie Collardeau-Frachon. 14

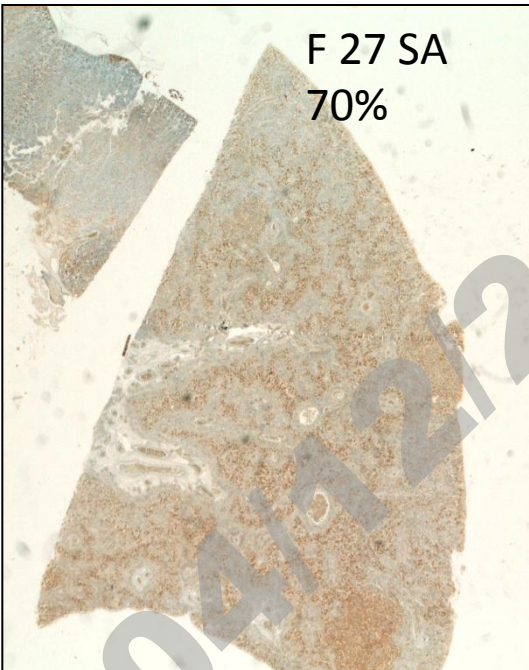
		HES	Perls	C5b9		
Cas HNAI		 x40  x200			34SA Décès à 35j 100%	
			<p><b>Influence de :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ <b>fixation</b> : formol (cas anciens, centres différents)</li> <li>→ type de prélèvement: biopsie hépatique ou autopsie</li> <li>→ <b>Age</b> : nouveau-né (77,5%)/ foetus (62%)</li> <li>→ <b>Perls</b> : non</li> <li>→ <b>facteurs immuns ?</b></li> </ul>			38SA Décès à 45j 100%
						
						

*Relevance of C5b9 immunostaining in the diagnosis of neonatal hemochromatosis : a retrospective multicenter study  
Estelle Dubruc, Beatrice Nadaud, Sophie Collardeau-Frachon.*

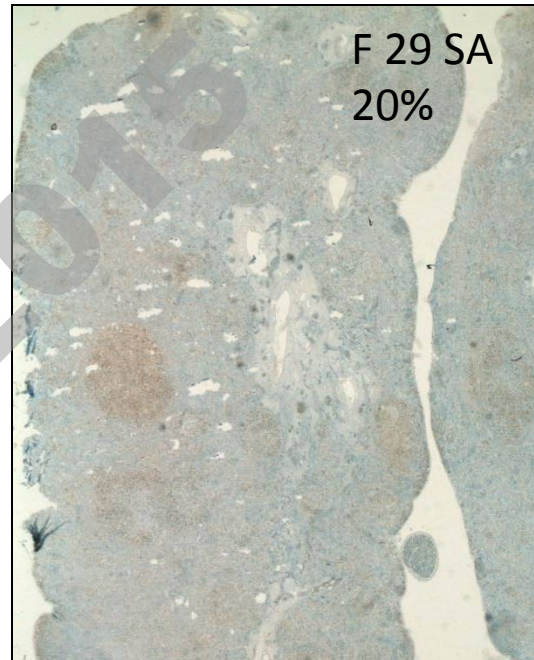
Né à 32SA décès à 5j  
40%



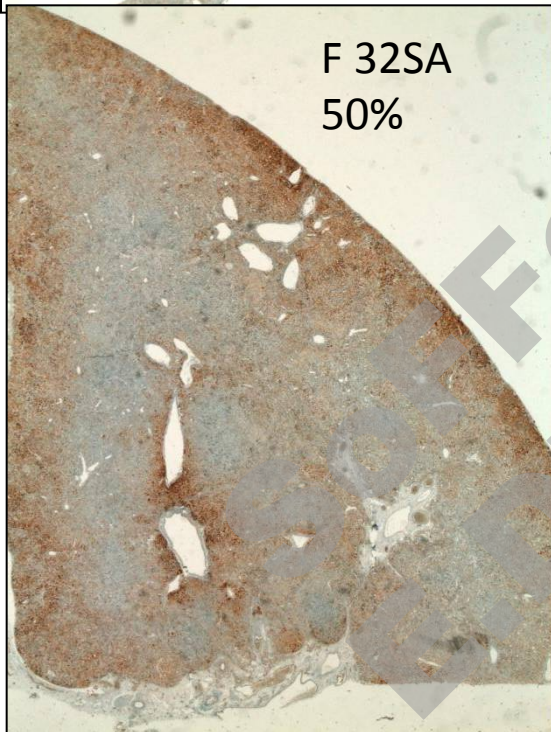
F 27 SA  
70%



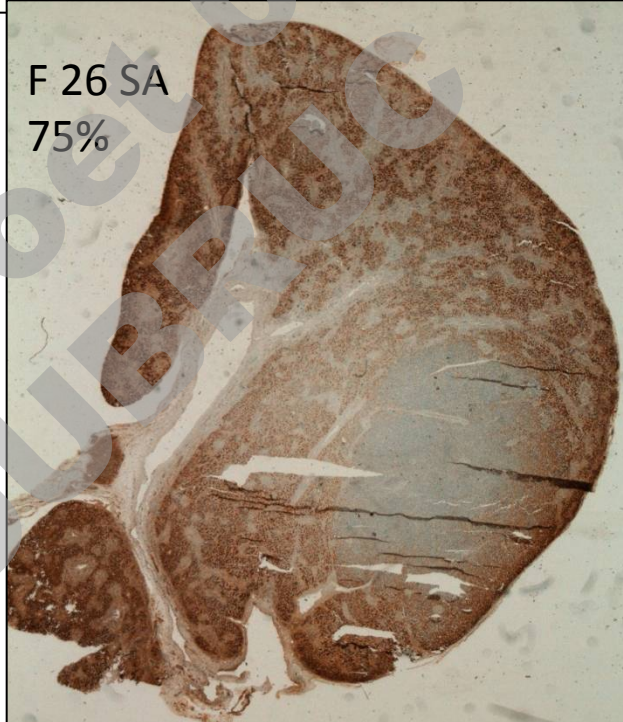
F 29 SA  
20%



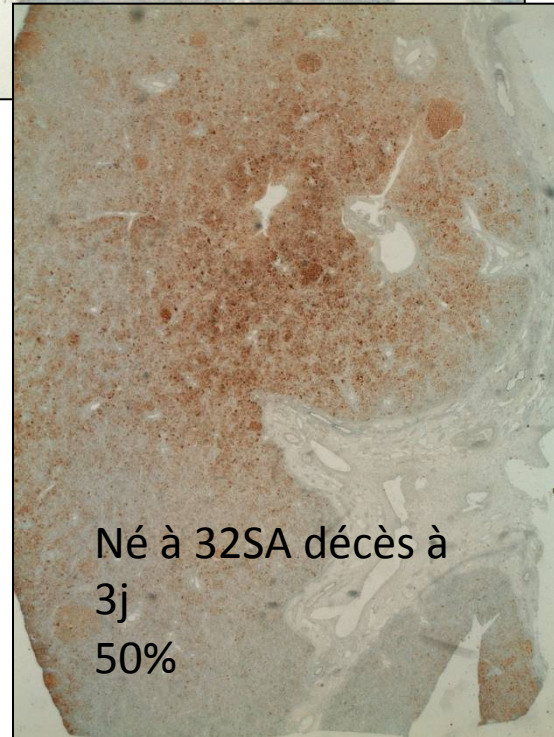
F 32SA  
50%



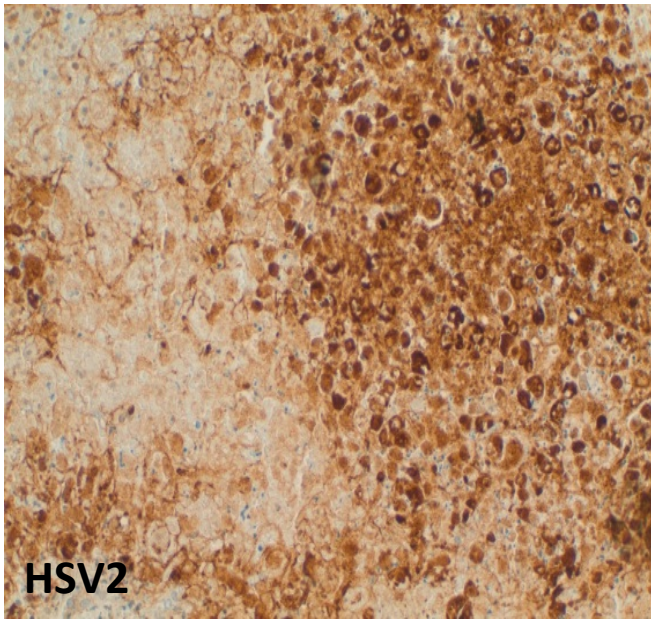
F 26 SA  
75%



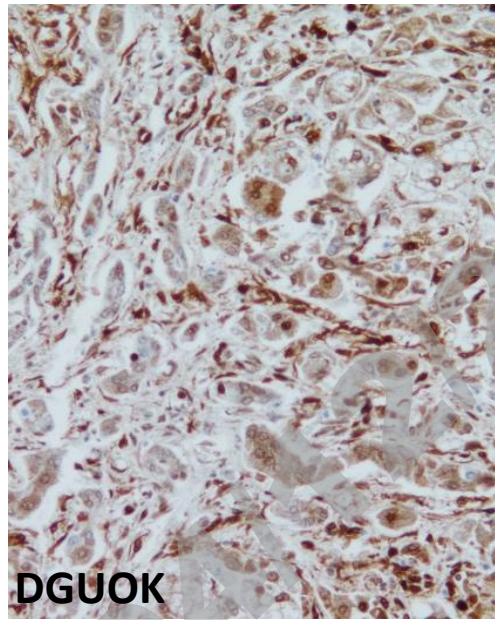
Né à 32SA décès à  
3j  
50%



Cas HNAI



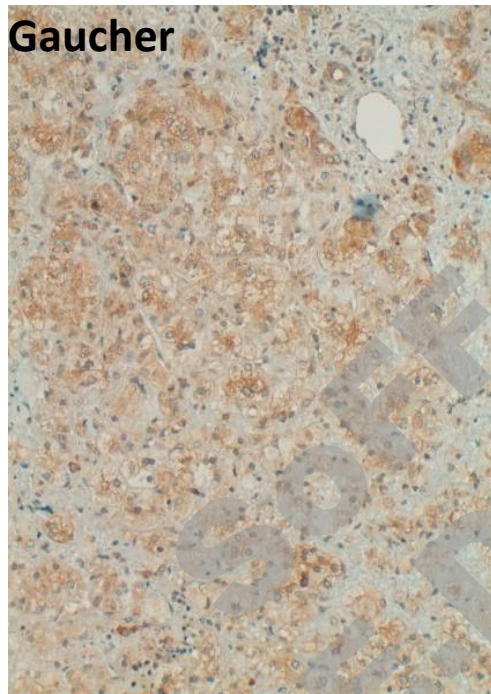
**HSV2**



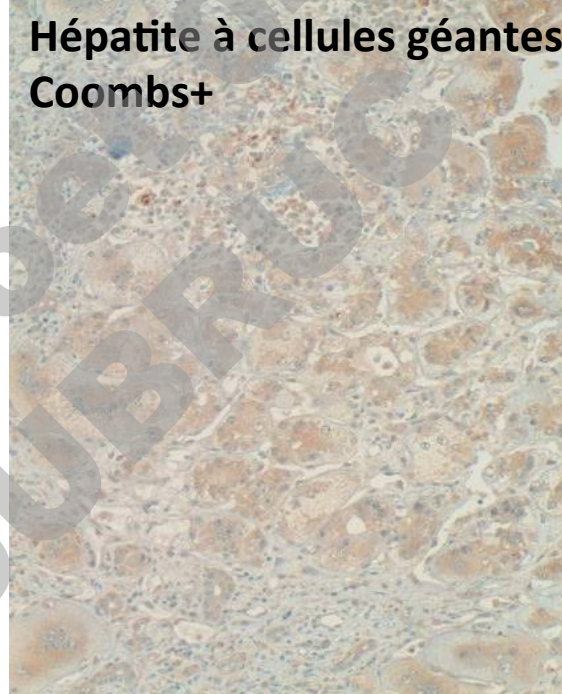
**DGUOK**



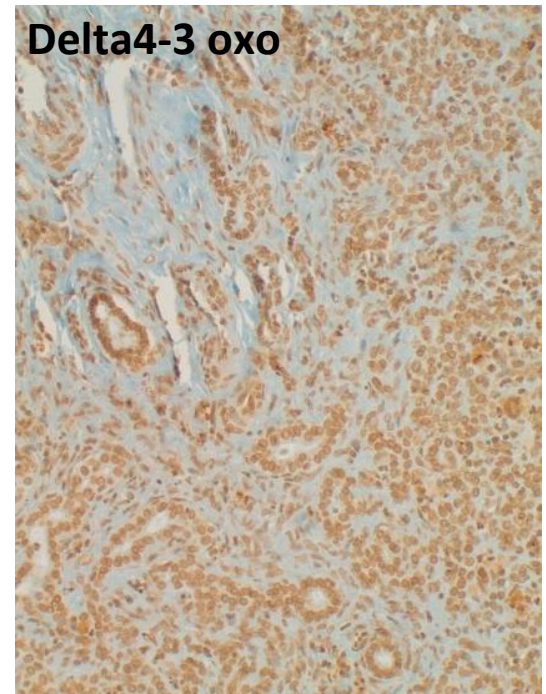
**Parvo**



**Gaucher**



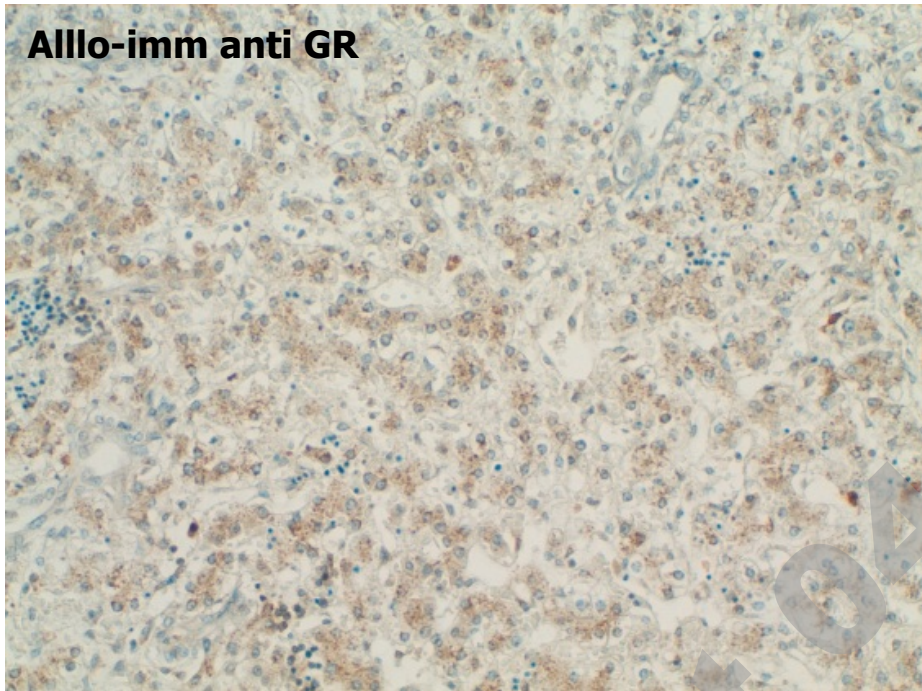
**Hépatite à cellules géantes  
Coombs+**



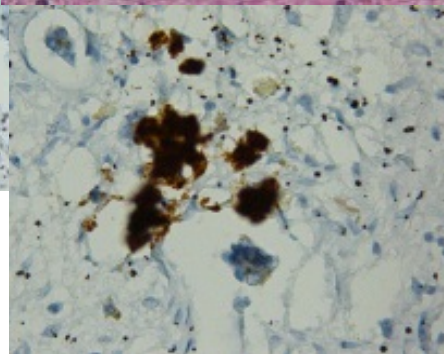
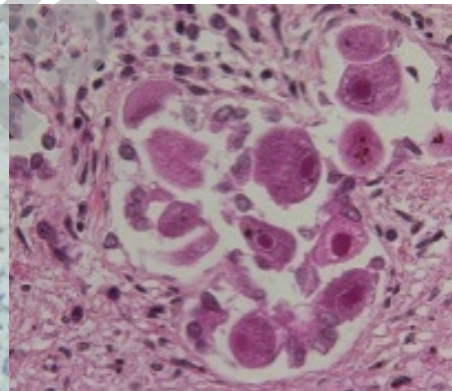
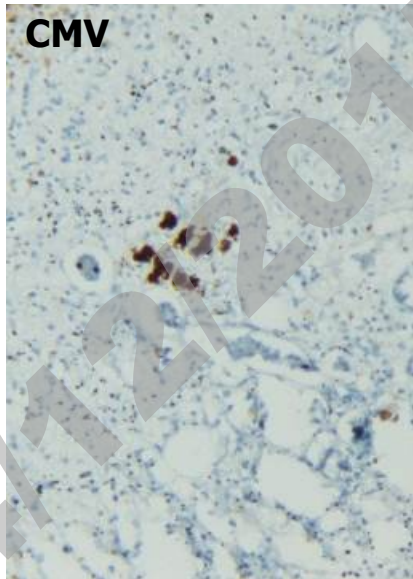
**Delta4-3 oxo**

**Cas non HNAI**

**Allo-imm anti GR**

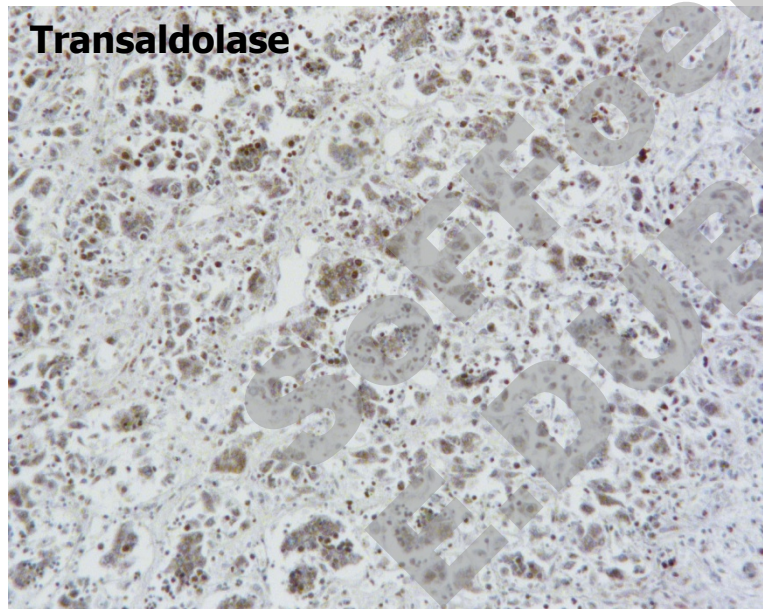


**CMV**

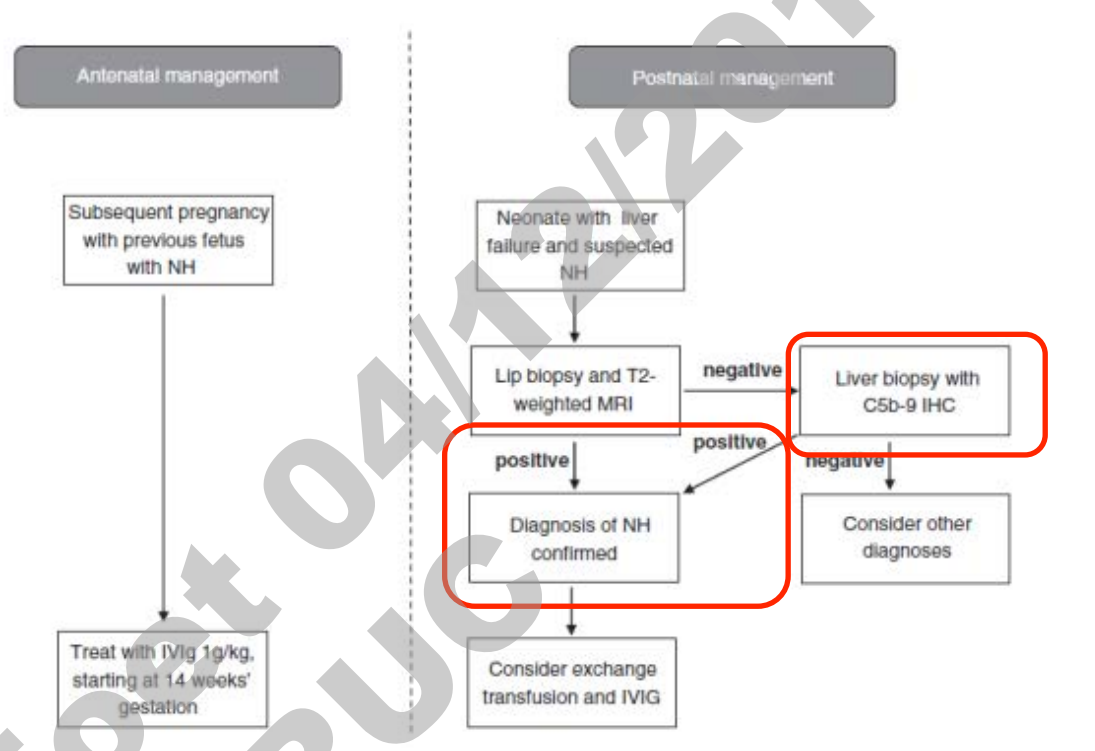


**Cas non HNAI**

**Transaldolase**



# Algorithme diagnostic

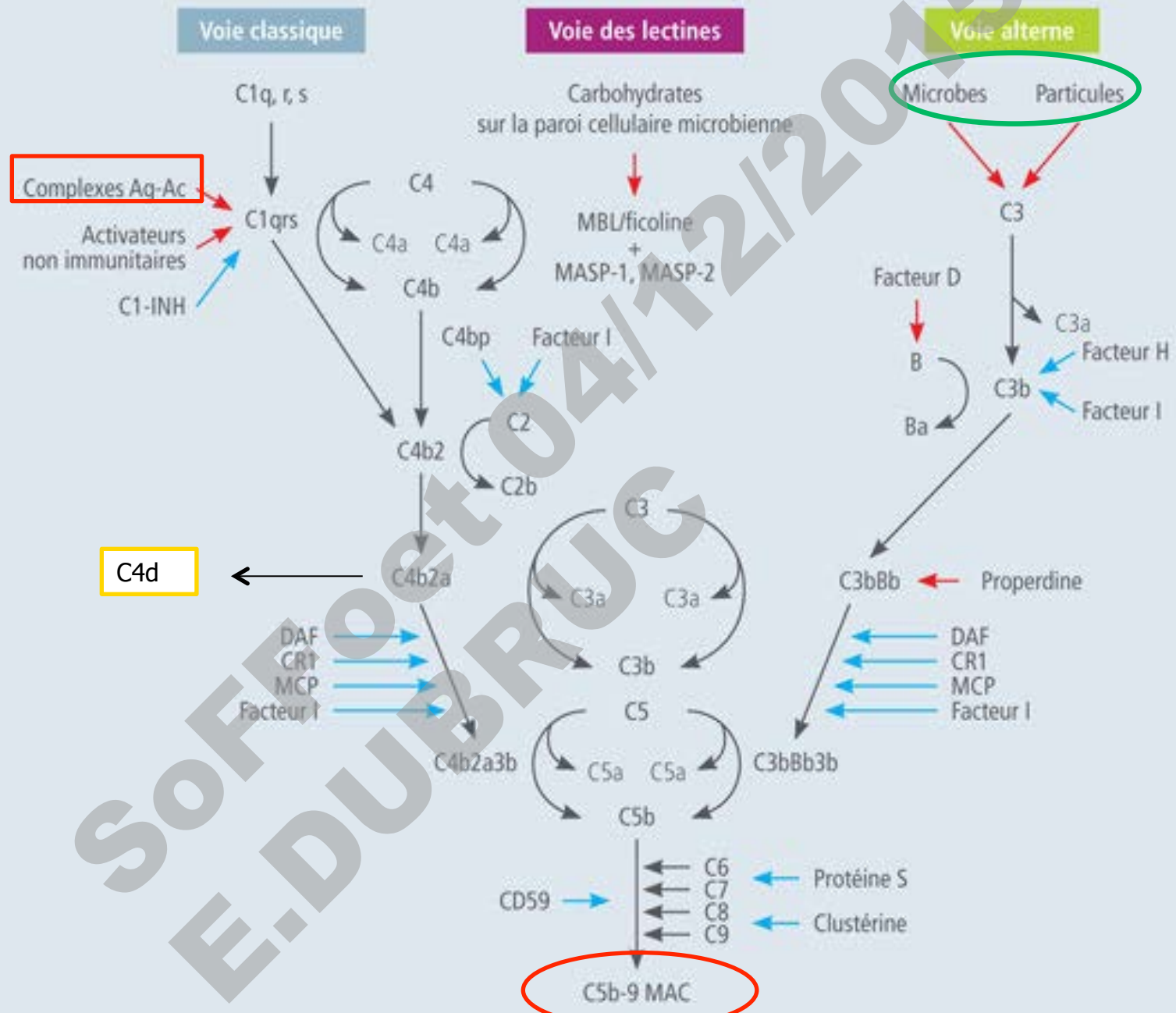


Lopriore E, Mearin ML, Oepkes D, Devlieger R, Whittington PF. Neonatal hemochromatosis: management, outcome, and prevention: Neonatal hemochromatosis. *Prenat Diagn.* 2013 Oct;1-5.

➔ **C5b9** seul sur prélèvement biopsique = **insuffisant** pour affirmer HNAI

- Données cliniques et paracliniques (examens biologiques, imagerie)
- **HES** :  
élimination des principaux diagnostics différentiels : architecture du foie, lésions cellulaires hépatocytaires particulières
- **Perls** : surcharge en fer et localisation





Immunohistochemical detection of C5b-9<sub>(m)</sub>  
in myocardium: an aid in distinguishing  
infarction-induced ischemic heart muscle necrosis  
from other forms of lethal myocardial injury

H. Thomsen\*, H. Held

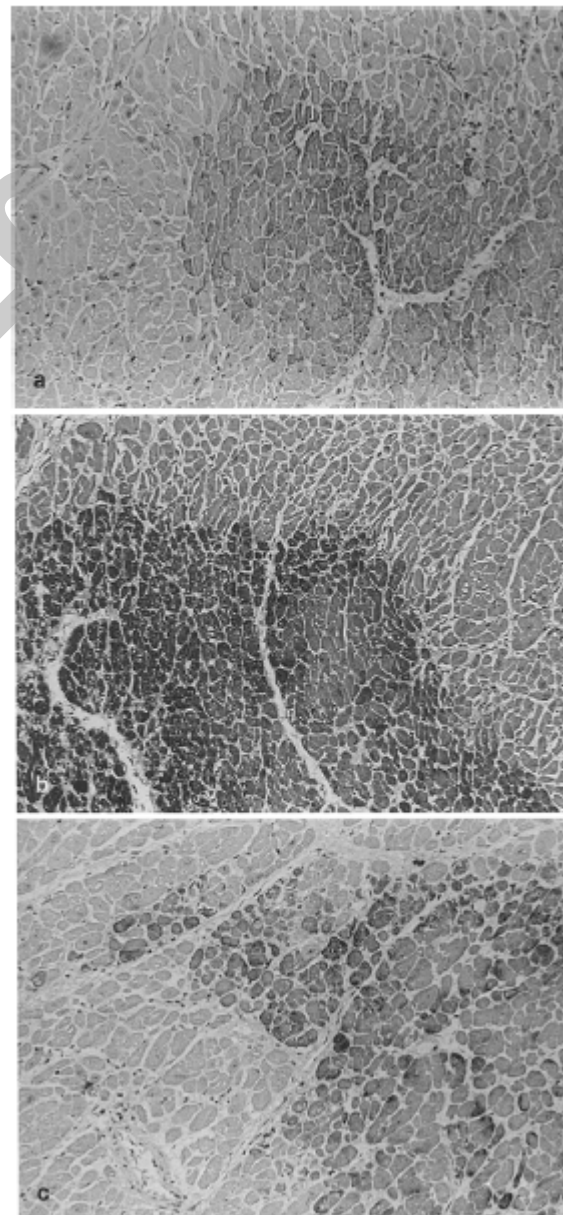
*Institute of Forensic Medicine, Christian-Albrechts University of Kiel, 24105 Kiel, Germany*

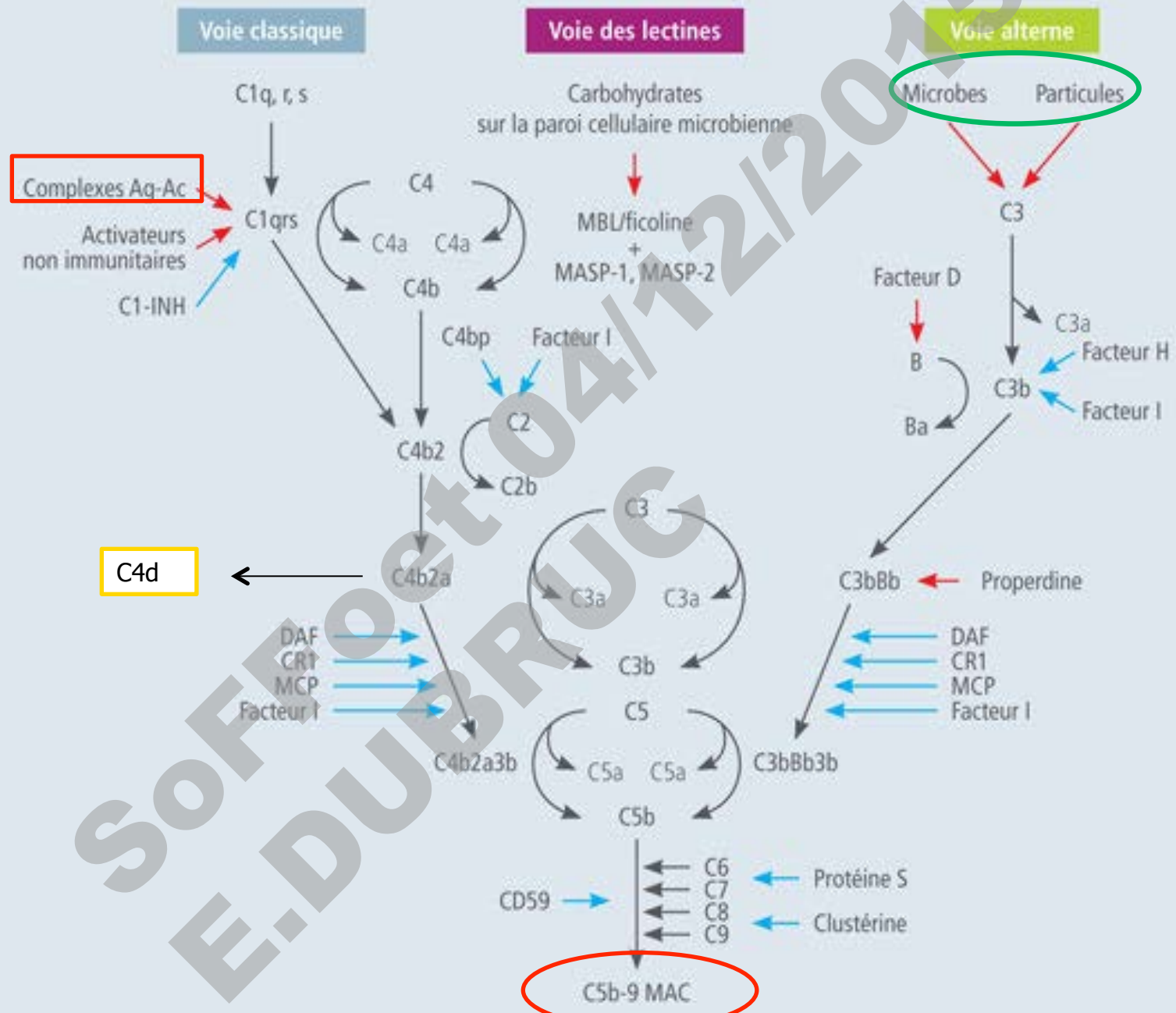
Received 6 August 1993; revision received 26 January 1994; accepted 11 August 1994

Erik Edston · Karin Kawa

**Immunohistochemical detection of early myocardial infarction.  
An evaluation of antibodies  
against the terminal complement complex (C5b-9)**

Int J Legal Med (1995) 108:27–30





## Immunohistochimie C4d

- Groupe HNAI : **co expression** C5b9/C4d dans 38% des prélèvements
- Coexpression C5b9 et C4d :
  - HSV
  - PB19
  - IFME
  - HAI (cellules géantes, LKM1+)
  - Déf. synthèse en ac. biliaire
  - Gaucher
  - mucoviscidose
  - cytopathies mitochondriales

## Mécanismes impliqués dans l'HNAI?

→ Étude immunohistochimique C4d : ne permet pas d'affirmer activation de la voie classique du complément

➡ Maladie immunitaire? (Antigène foetal non identifié)

➡ **Anomalies des protéines de régulation du complément**

CD59 exprimé fortement dans le foie foetal dès le 1<sup>er</sup> trimestre

→ **Déficit CD59 dans l'HN(AI?)**

Thérapies  
ciblées?

