



UEL 343

**Du fondamental à l'appliqué :
exemple de la biologie vasculaire**

Les vascularites autoimmunes

Aude Gleizes

aude.gleizes@universite-paris-saclay.fr

PLAN DU COURS

INTRODUCTION GENERALE

DIAGNOSTIC CLINICO-BIOLOGIQUE DES VASCULARITES A ANCA

MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES CENTRES SUR LE NEUTROPHILE

- *Stimulation excessive des neutrophiles*
- *Rôle pathogène des ANCA*
- *Rôle du système du complément*

PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

Introduction générale

- **100aine de maladies autoimmunes identifiées : 5 à 10% de la population mondiale**
- **3ème cause de morbidité après les maladies cardiovasculaires et les cancers dans les pays développés**
- **Pathologies chroniques inflammatoires évoluant par poussées et rémissions**
- **Maladies multifactorielles d'étiologie inconnue :**
 - * **terrain génétique prédisposant**
 - * **facteurs environnementaux: infections, agents physico-chimiques...**

Rupture de tolérance aux antigènes du soi : autoréactivité pathologique

Classification des maladies autoimmunes

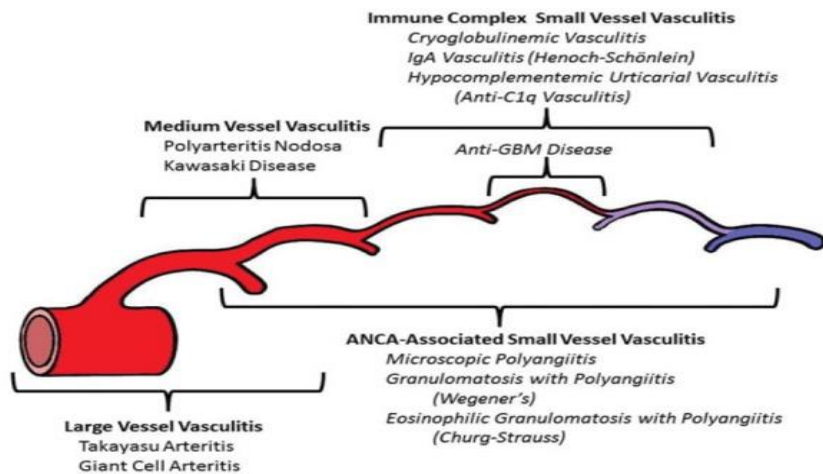
Maladies autoimmunes non spécifiques d'organes (maladies systémiques)

Connectivites

Lupus
Polyarthrite rhumatoïde
Syndrome de Sjögren
Sclérodermies
Myopathies

.....

Vascularites autoimmunes



Maladies autoimmunes spécifiques d'organe

Organes ciblés	maladies
Intestin	Maladie de Crohn, RCH, maladie coeliaque
Estomac	Maladie de Biermer
Foie	Hépatite AI Cholangite biliaire primitive (CBP)
Pancreas	Diabète de type 1
Thyroïde	Thyroïdite de Hashimoto et de Basedow
Gaine de myéline	Sclérose en plaques

Vascularites : inflammation paroi vasculaire +++ conduisant à un rétrécissement ou obstruction des vaisseaux

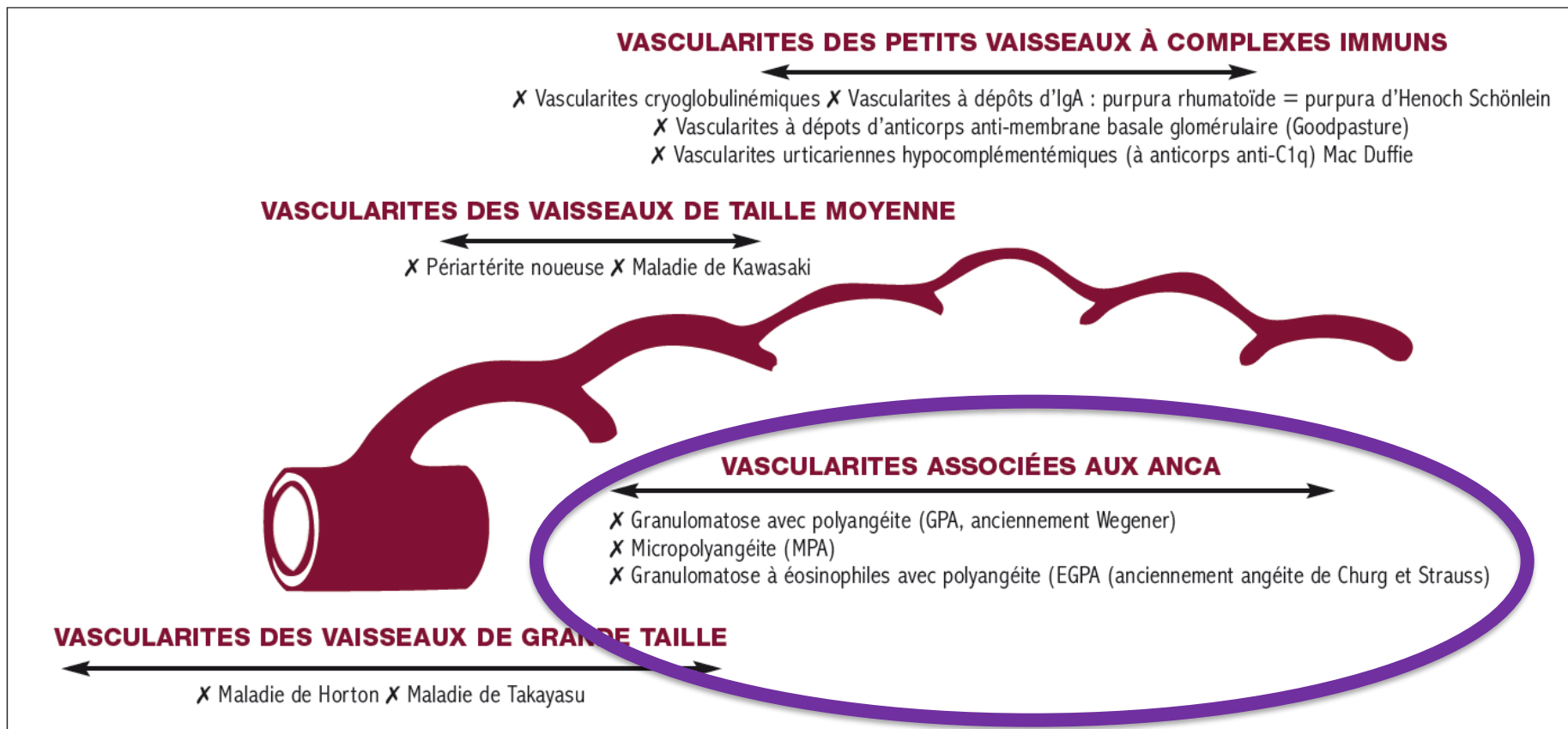


FIGURE 1 Classification des vascularites selon la taille des vaisseaux atteints. D'après Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, *et al.* 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65(1):1-11.

Vascularites nécrosantes

Autoanticorps = ANCA

Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies

Tropisme privilégié : rein / poumon

Diagnostic clinico-biologique

Approche diagnostique

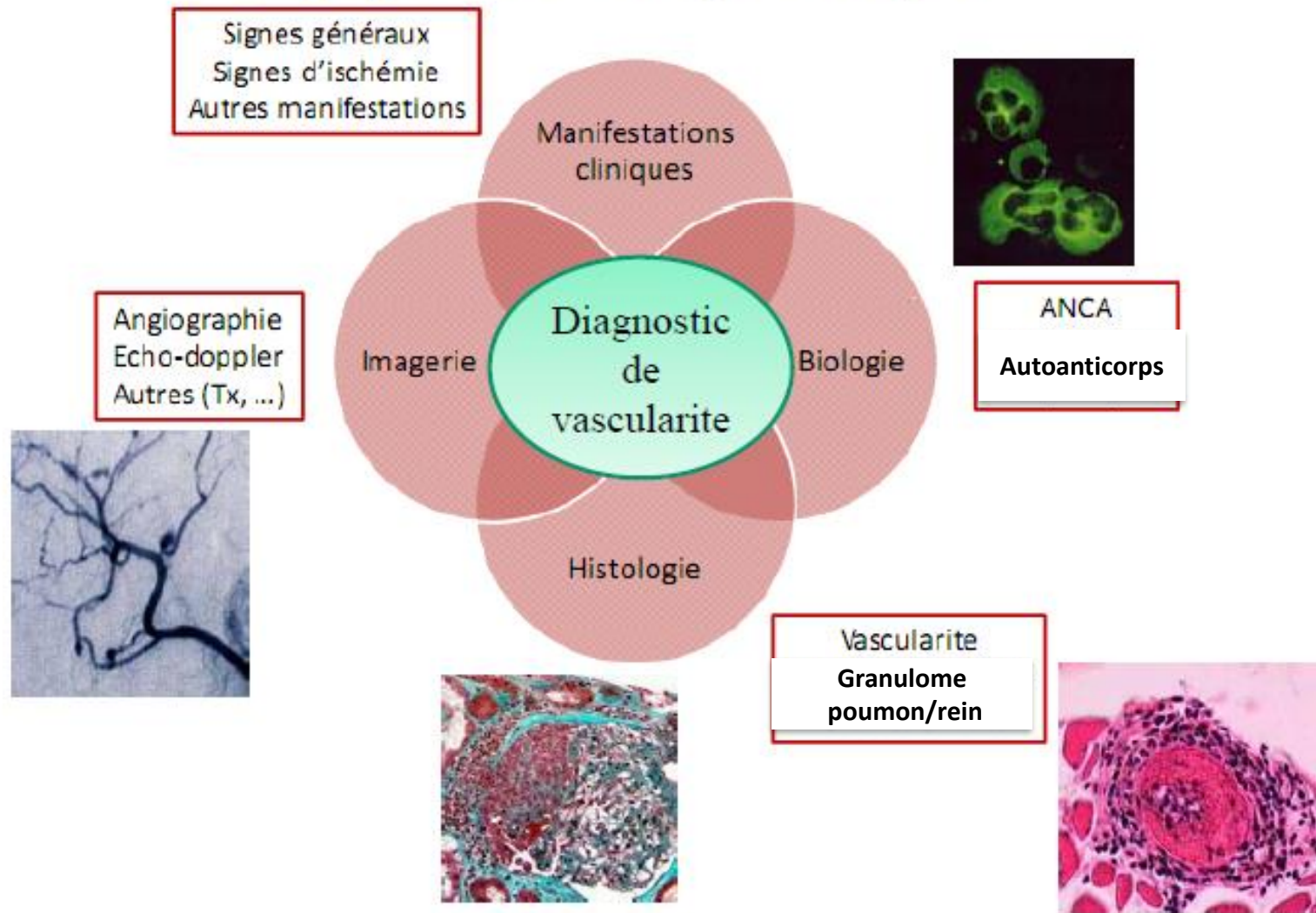


TABLEAU 12

Diagnostic des différentes vascularites nécrosantes

	GPA	MPA	EGPA	PAN
Taille des vaisseaux	petits	petits	petits	moyens
Atteinte ORL	+++	0	++	0
Atteinte pulmonaire	+++	++	+++	
Asthme	0	0	+++	0
Atteinte rénale glomérulaire	+++	+++	+	0
Atteinte rénale vasculaire	0	0	0	+++
Arthralgies	++	++	++	++
Multinévrite	+	++	+++	+++
Atteinte digestive	0	+	++	++
Atteinte cardiaque	+	+	++*	+
Hyperéosinophilie	±	0	+++	±
c-ANCA	++ /PR3	-	-	-
p-ANCA	-	++/ MPO	+/MPO	-
microanévrismes	0	0	0	++

* Quand ANCA absents.

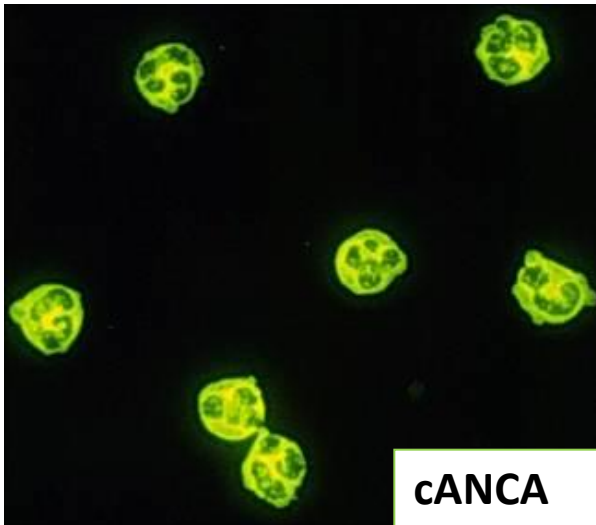
Gravité : Syndrome pneumo-rénal

Diagnostic des autoanticorps

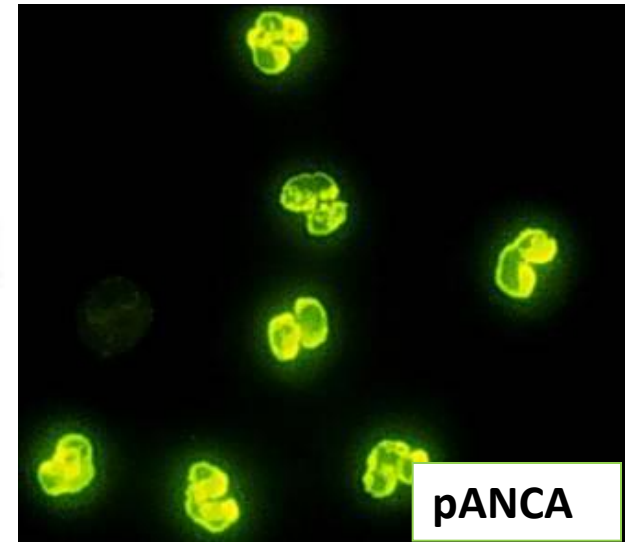
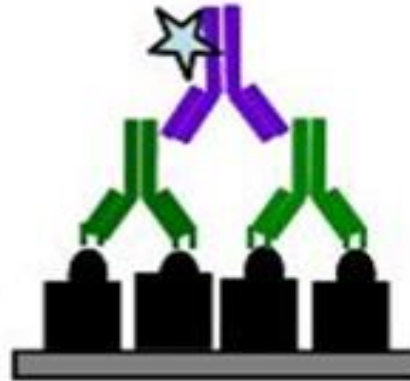
1



Ac anti-cytoplasme de neutrophiles : ANCA
Immunofluorescence indirecte sur frottis de PNN



Marquage cytoplasmique



Marquage périnucléaire

2

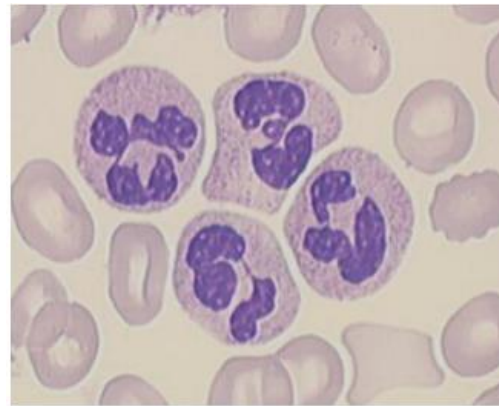
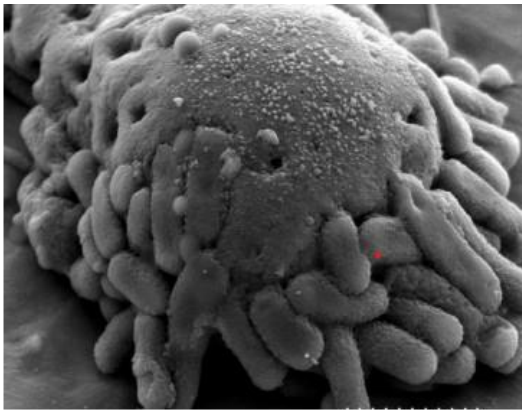


Identification de la cible par technique ELISA

Cible: PR3 (protéinase 3)
90% GPA

Cible: MPO
(myéloperoxydase)
60% des MPA ou GEPA

Mécanismes physiopathologiques centrés sur le neutrophile



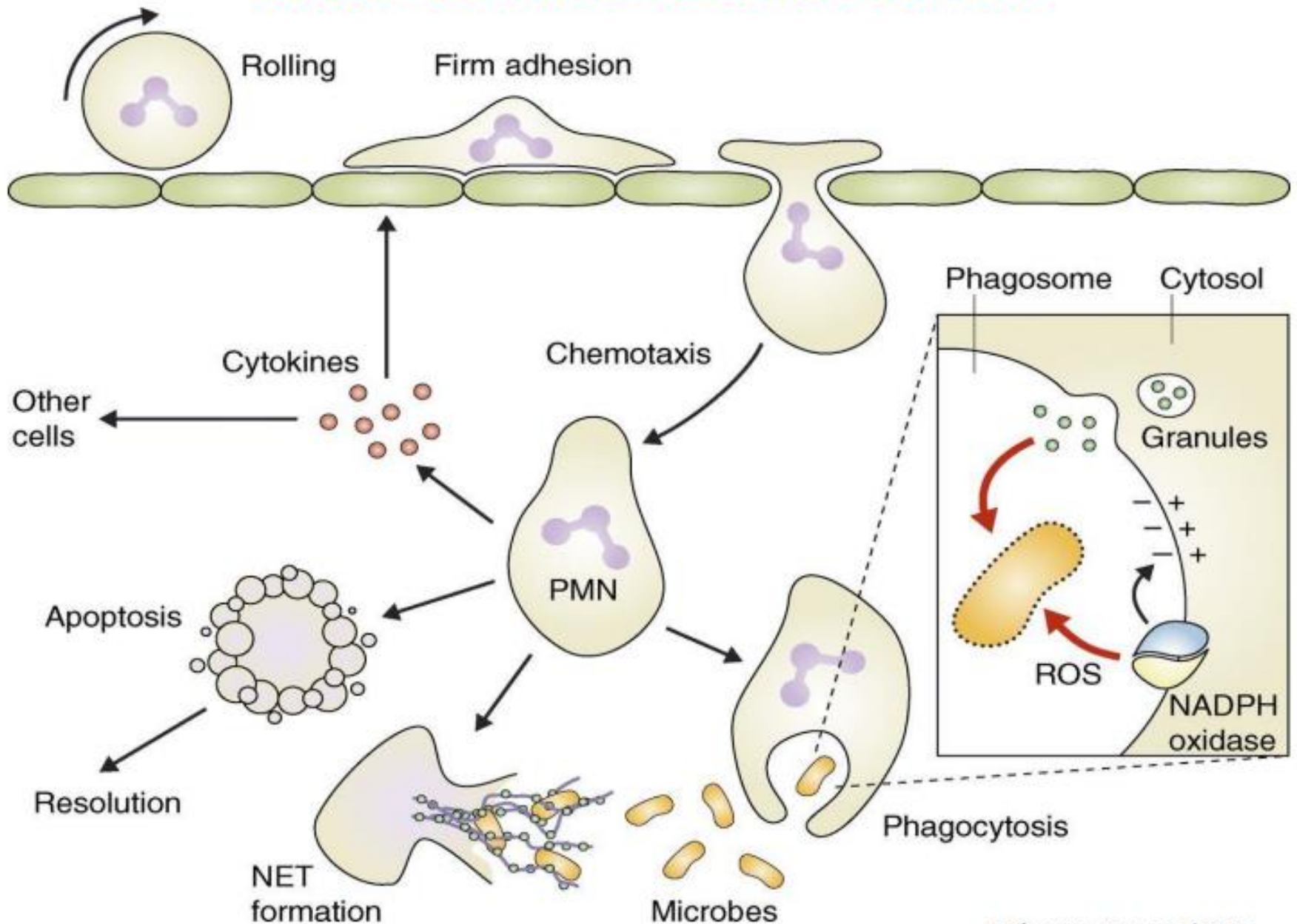
Les neutrophiles détruisent leur cible par différents mécanismes :

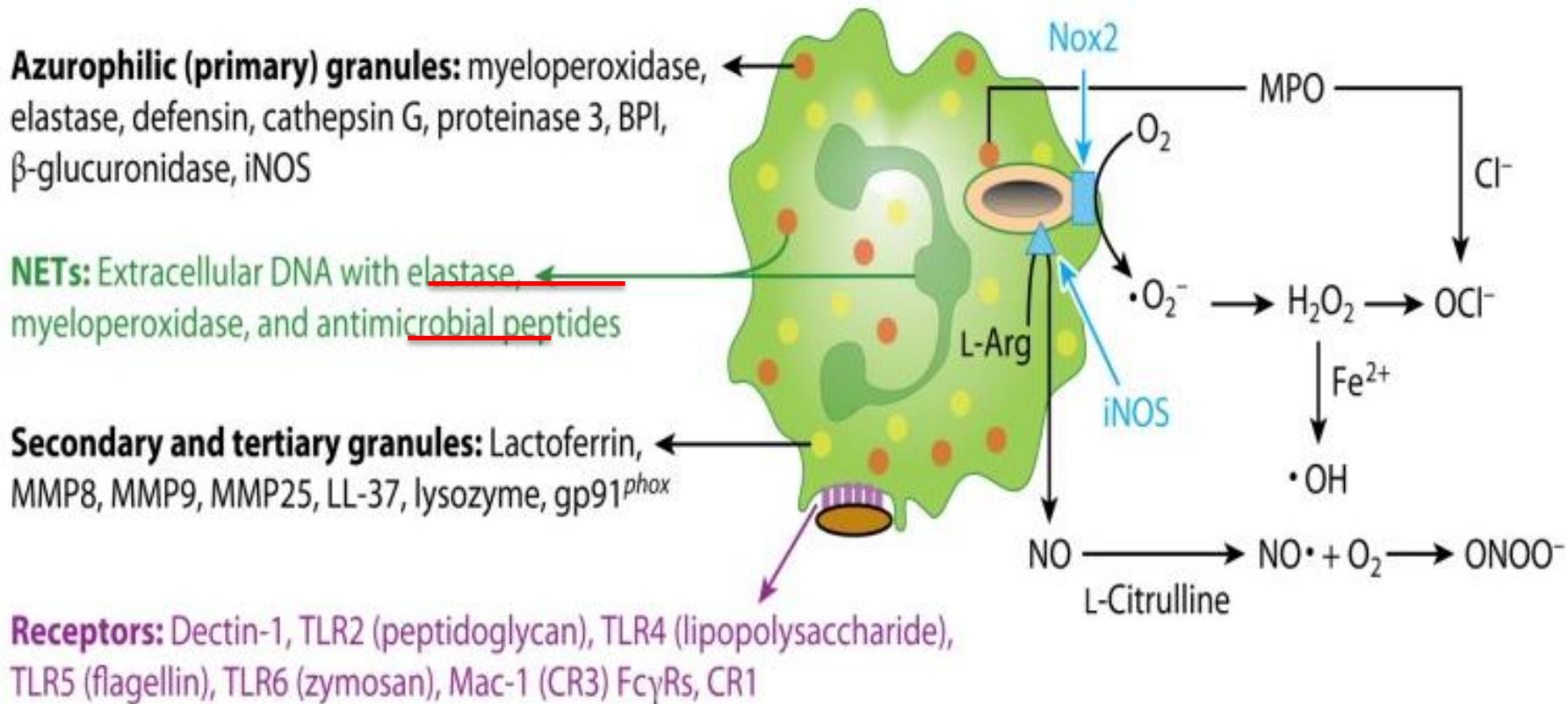
1- Phagocytose et activation de l'explosion oxydative (production des FRO)

2- Dégranulation de médiateurs enzymatiques pré-formés protéolytiques

3- Libération de NETs

Les grandes fonctions des neutrophiles:

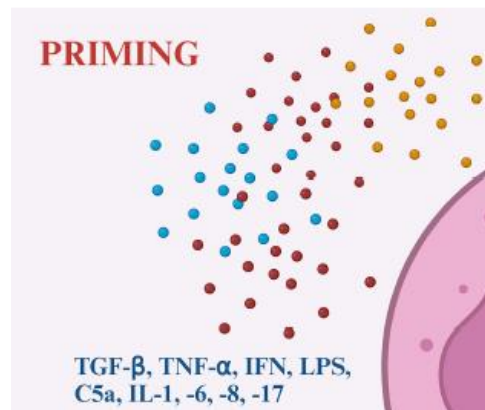




Mayadas et al, Ann Rev Pathol Mech Dis, 2014

Médiateurs produits dans le phagolysosome mais aussi à l'extérieur de la cellule entraînant des lésions vasculaires et tissulaires

POINT DE DEPART :
Stimulation
excessive des neutrophiles
conséquences de
l'environnement inflammatoire
des phases de poussées



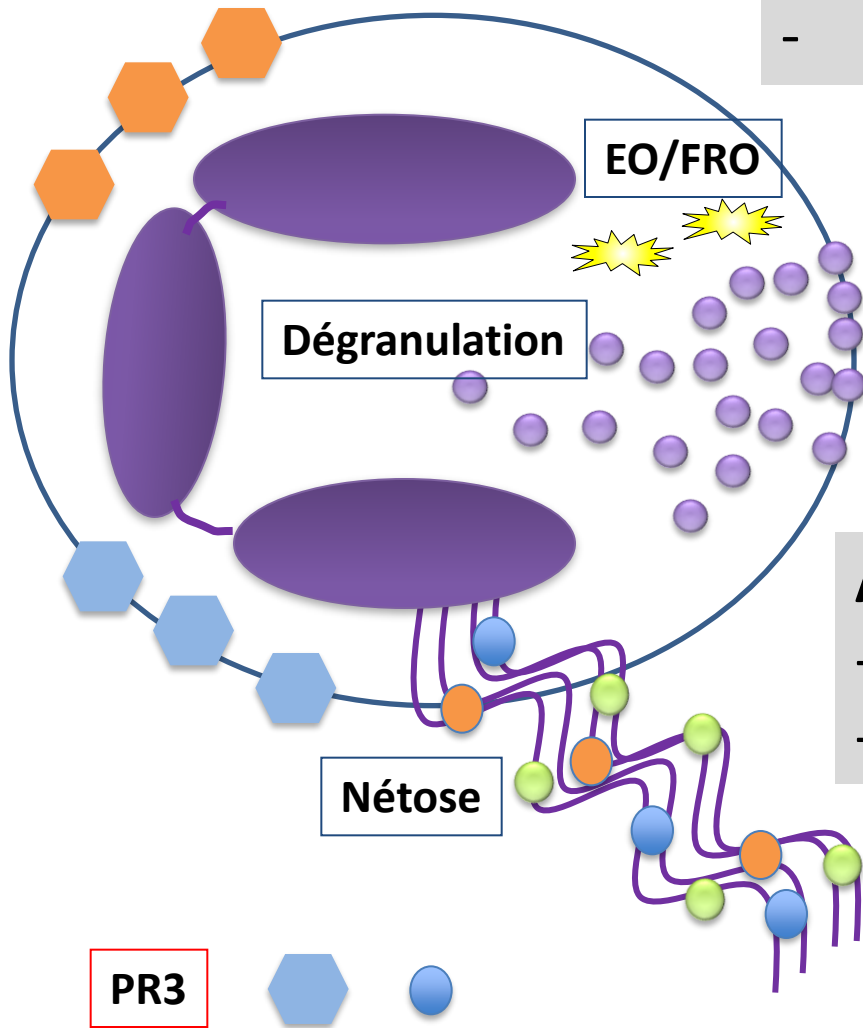
**Démasquage d'autoantigènes de localisation
habituelle intra-cellulaire**



**Activation de la réponse humorale et
production d'autoanticorps de type ANCA**
notion du soi ignoré

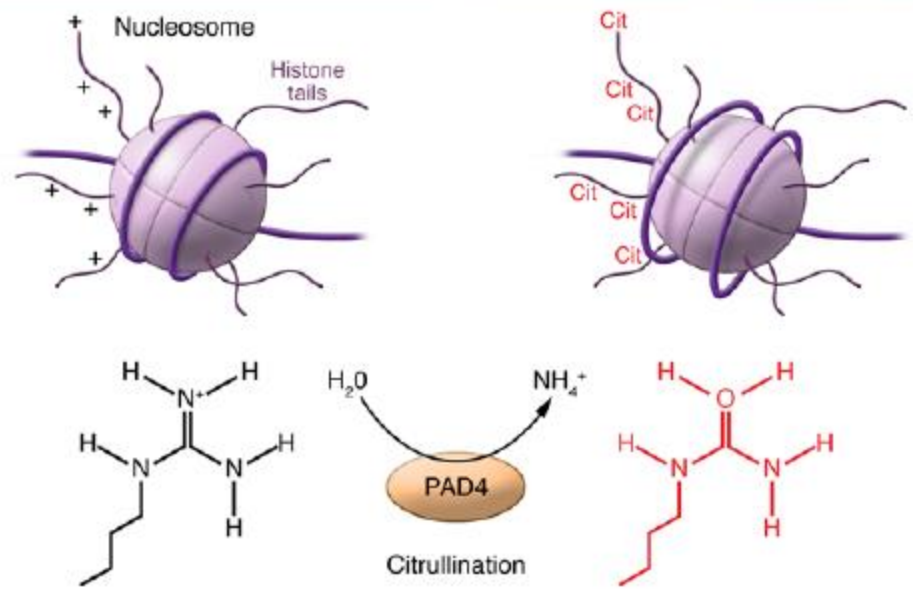
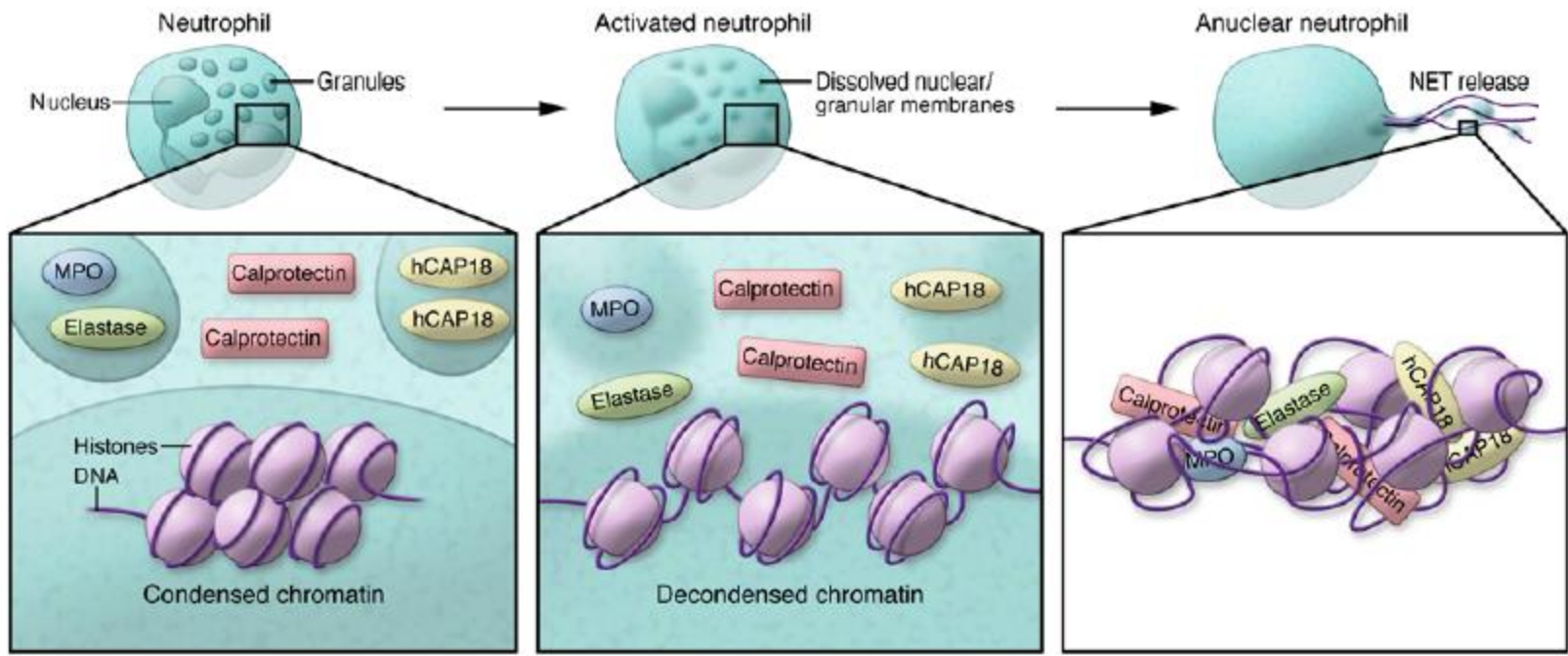
Autoantigènes granulaires transloqués à la membrane des neutrophiles

- Myéloperoxydase (MPO)
- Protéinase 3 (PR3)

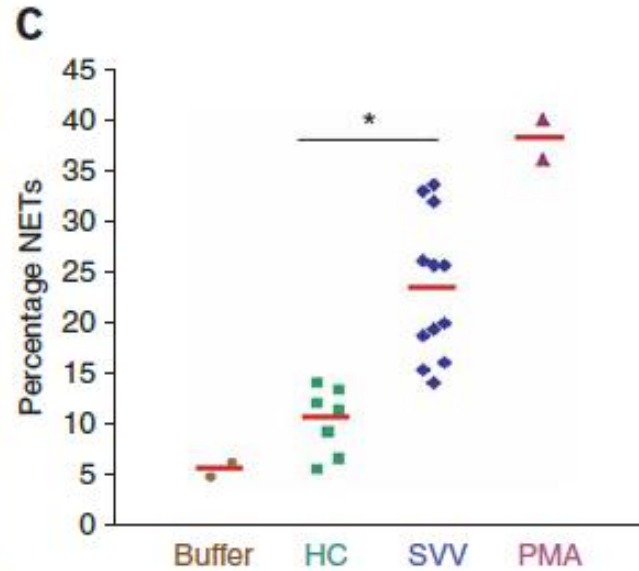
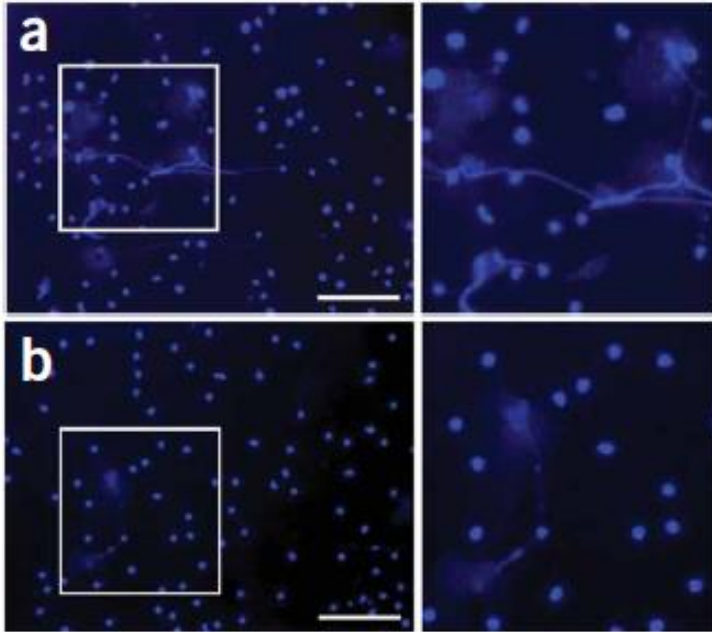


Autoantigènes localisés sur les NETs

- Myéloperoxydase (MPO)
- Protéinase 3 (PR3)

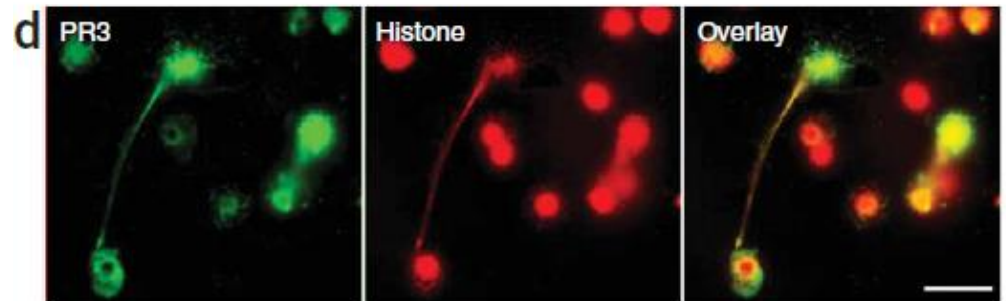


NETOSE et vascularite à ANCA : ESSAIS IN VITRO

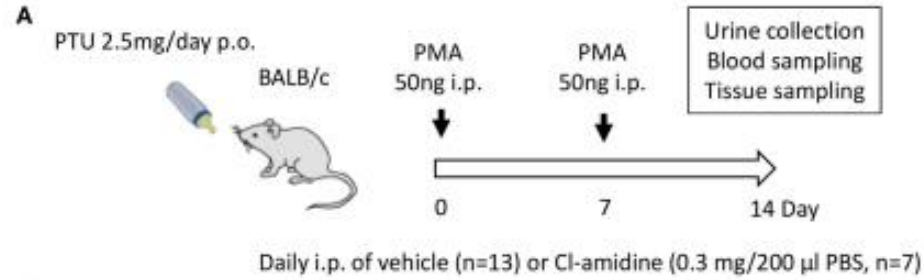


PN primés par TNF et incubés 3h avec ANCA (a) ou IgG contrôle (b)

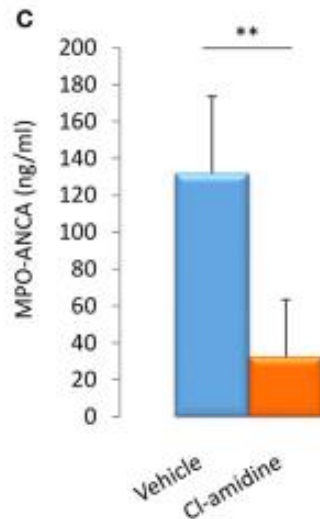
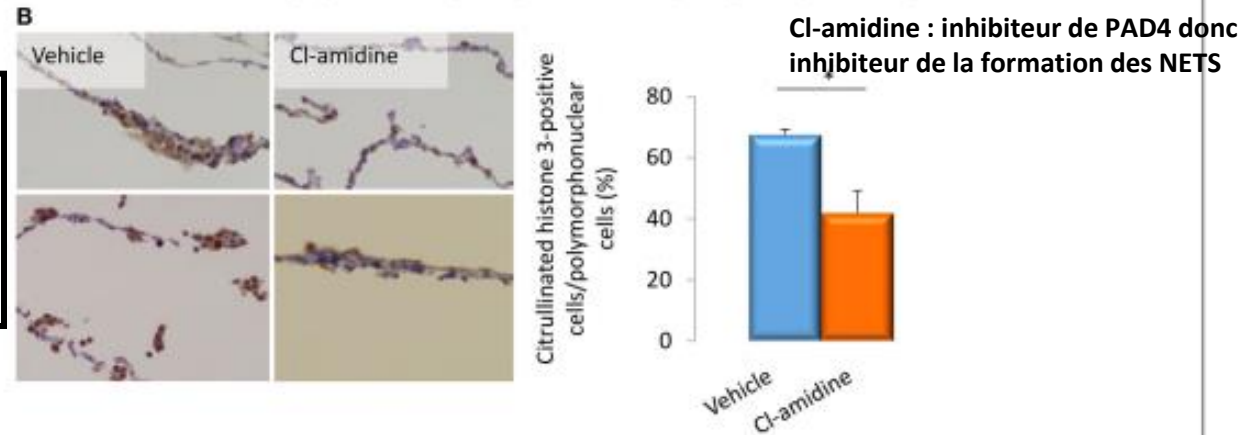
Analyse par co-marquage par immunofluorescence: ADN/protéines des NETS



NETOSE et vascularite à ANCA : ESSAIS IN VIVO CHEZ L'ANIMAL

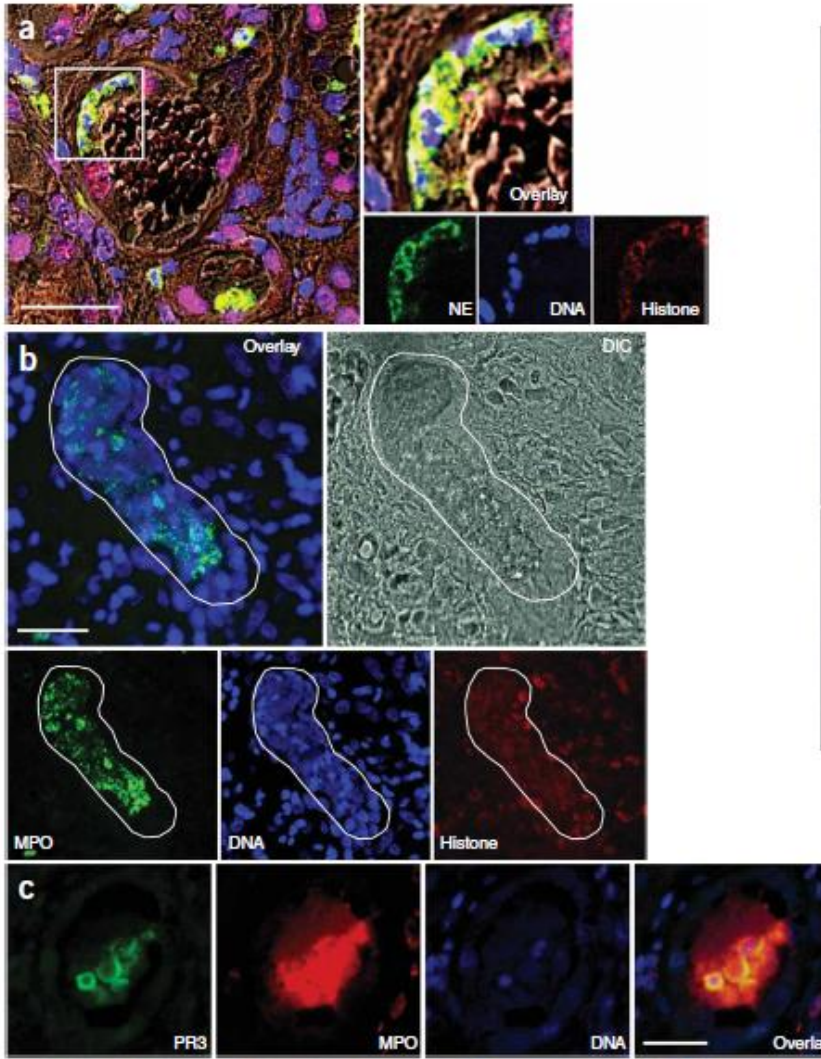


Immunohistochimie:
marquage des histones
citrullinées sur coupe de
péritoine



Quantification des Ac anti-MPO
dans le sérum des souris traitées
ou pas par l'inhibiteur de PAD 4

NETOSE et vascularite à ANCA: *Essais ex vivo sur biopsies de patients*



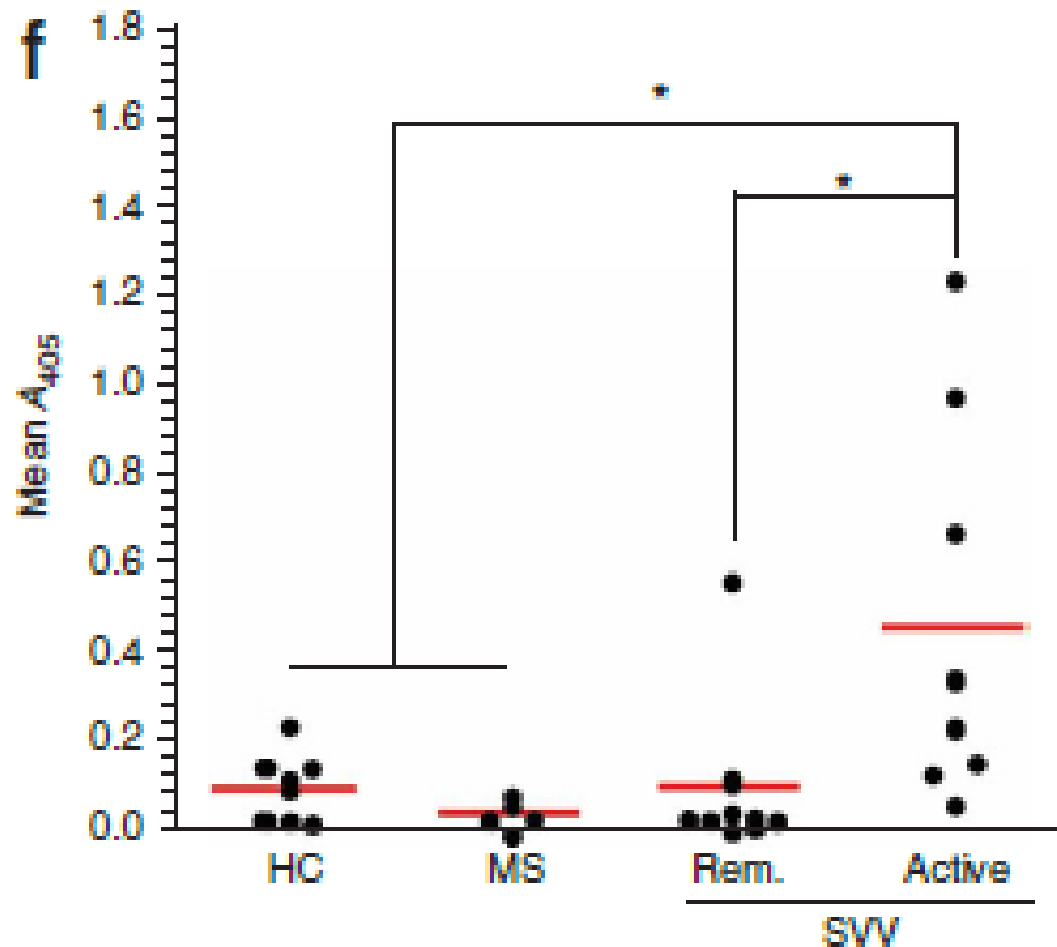
a- IF sur coupe de glomérule :
colocalisation DNA/ histones /
élastase

b- Microscopie confocale :

* Colocalisation DNA/histones/MPO
(dépôts de NETs dans le tissu
inflammé)

* Colocalisation MPO/PR3/DNA
(dépôts de NETs à l'intérieur du
glomérule)

NETOSE et vascularite à ANCA : *Essais ex vivo sur sérum de patients*



Quantification des complexes MPO/DNA sur le sérum des patients

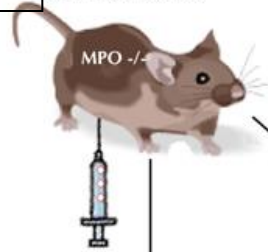
Rôle pathogène des ANCA

Modèle animal : preuve de concept

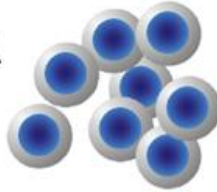
Souris sans MPO qui vont s'immuniser après injection intrapéritonéale de MPO

Transfert passif via les ANCA-MPO

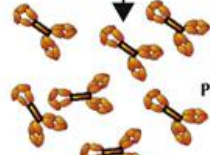
Immunisation des souris MPO^{-/-} par la MPO murine



Purification des splénocytes anti-MPO



Purification des IgG



Injection des IgG purifiés anti-MPO des souris MPO^{-/-} immunisées par la MPO



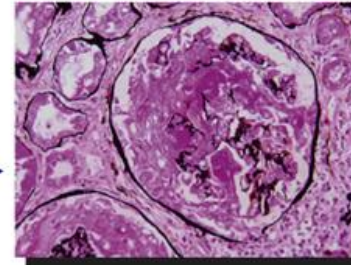
Souris normale

injection de 5×10^7 à 10^8 splénocytes des souris MPO^{-/-} immunisées par la MPO



Souris sans lymphocyte

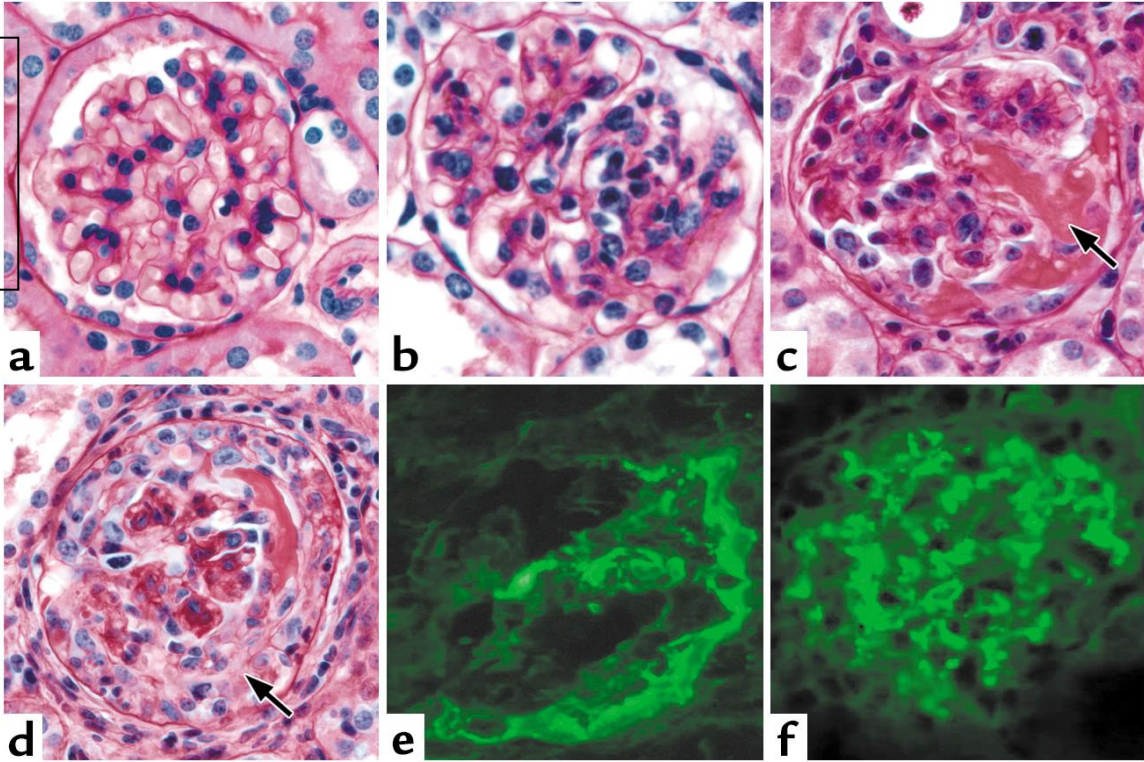
Glomérulonéphrite à croissants



Transfert via les lymphocytes

➔ L'injection des cellules lymphocytaires spécifiques anti-MPO ou d'Ac anti-MPO déclenche une glomérulonéphrite chez les souris

**Coupes de glomérules souris RAG-/-
ayant reçu 10⁸ splénocytes des souris
KO MPO immunisées: apparition
progressive de lésions +/- sévères**



**% de glomérules anormaux à J6
après l'injection d'Ac anti-MPO à
J0 et J3 versus témoin: Ac anti-BSA**

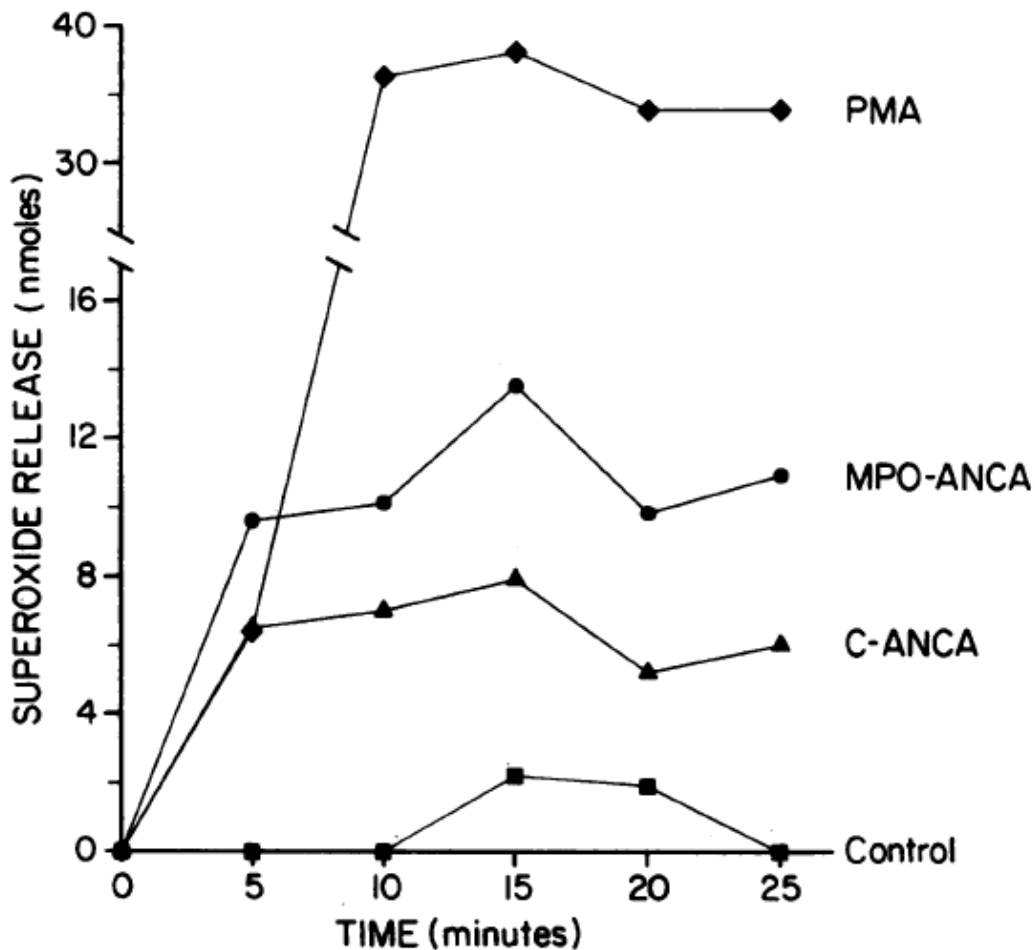
Table 2. Pathologic Findings in Mice that Received Two Injections of Anti-MPO IgG or Anti-BSA IgG

Group	Crescents (%)	Necrosis (%)	% Glomeruli with neutrophils	Neutrophils per positive glomerulus	Neutrophils per all glomeruli
Anti-MPO	12.0 ± 6.1	17.8 ± 7.8	30.27 ± 6.98*	3.08 ± 1.02*	0.97 ± 0.48*
Anti-BSA	0.0	0.0	5.97 ± 2.49	1.06 ± 0.08	0.07 ± 0.03

Mice received two doses of anti-MPO IgG (anti-MPO) or anti-BSA IgG (anti-BSA) on day 0 and day 3 with sacrifice on day 6. Crescent formation and necrosis are expressed as the percentage of glomeruli affected. Immunoenzyme microscopy to detect glomerular neutrophils is expressed as percentage of glomeruli with any neutrophils, average number of neutrophils per cross section of glomeruli with neutrophils, and average number of neutrophils per cross section of all glomeruli.

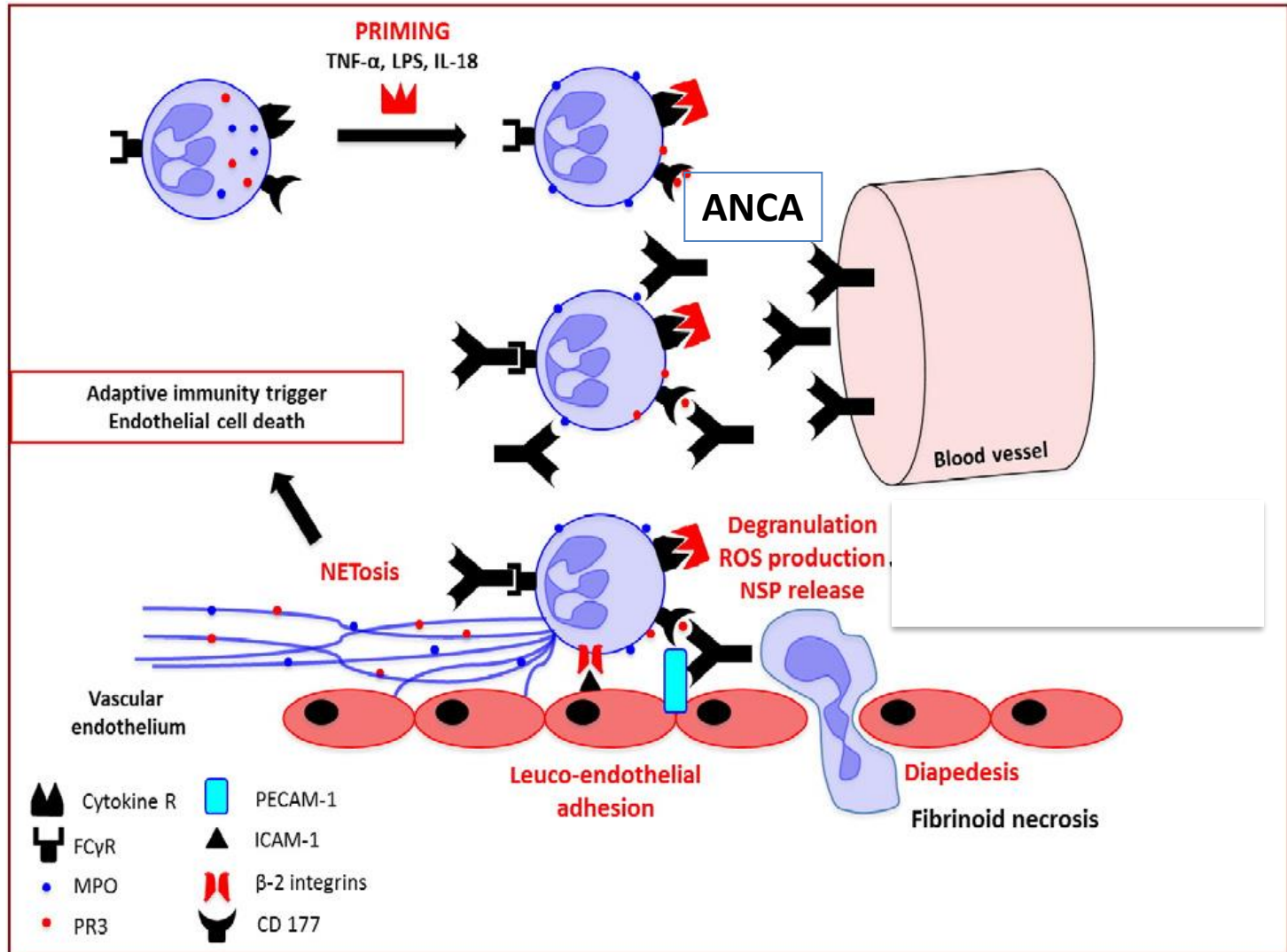
*Neutrophil infiltration is significantly higher ($P < 0.001$) in the anti-MPO group by all three methods of measuring glomerular infiltration.

Rôle des ANCA dans la production des FRO : essais *in vitro*

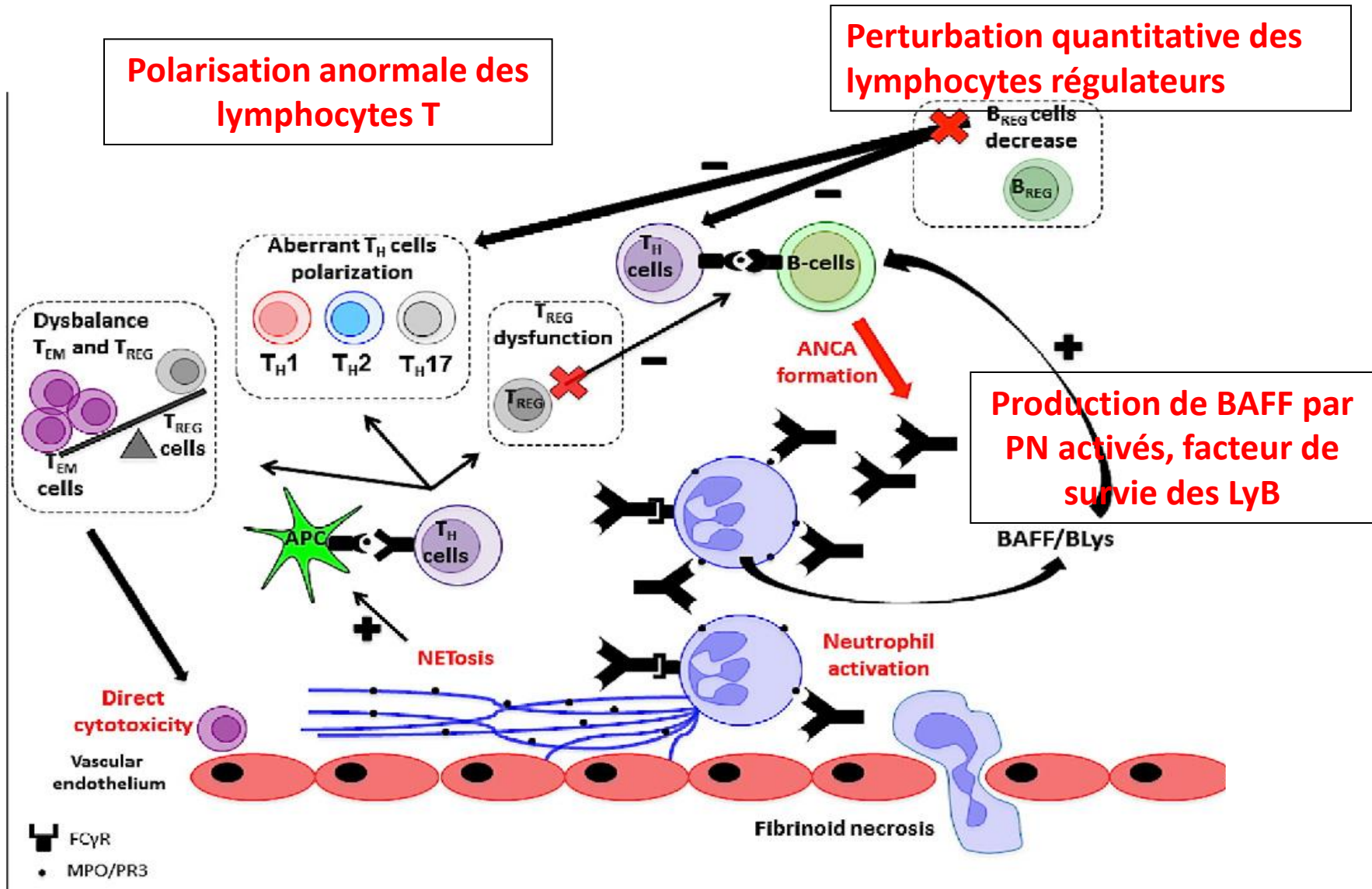


Production de FRO à partir de PN isolés et stimulés *in vitro* par des ANCA

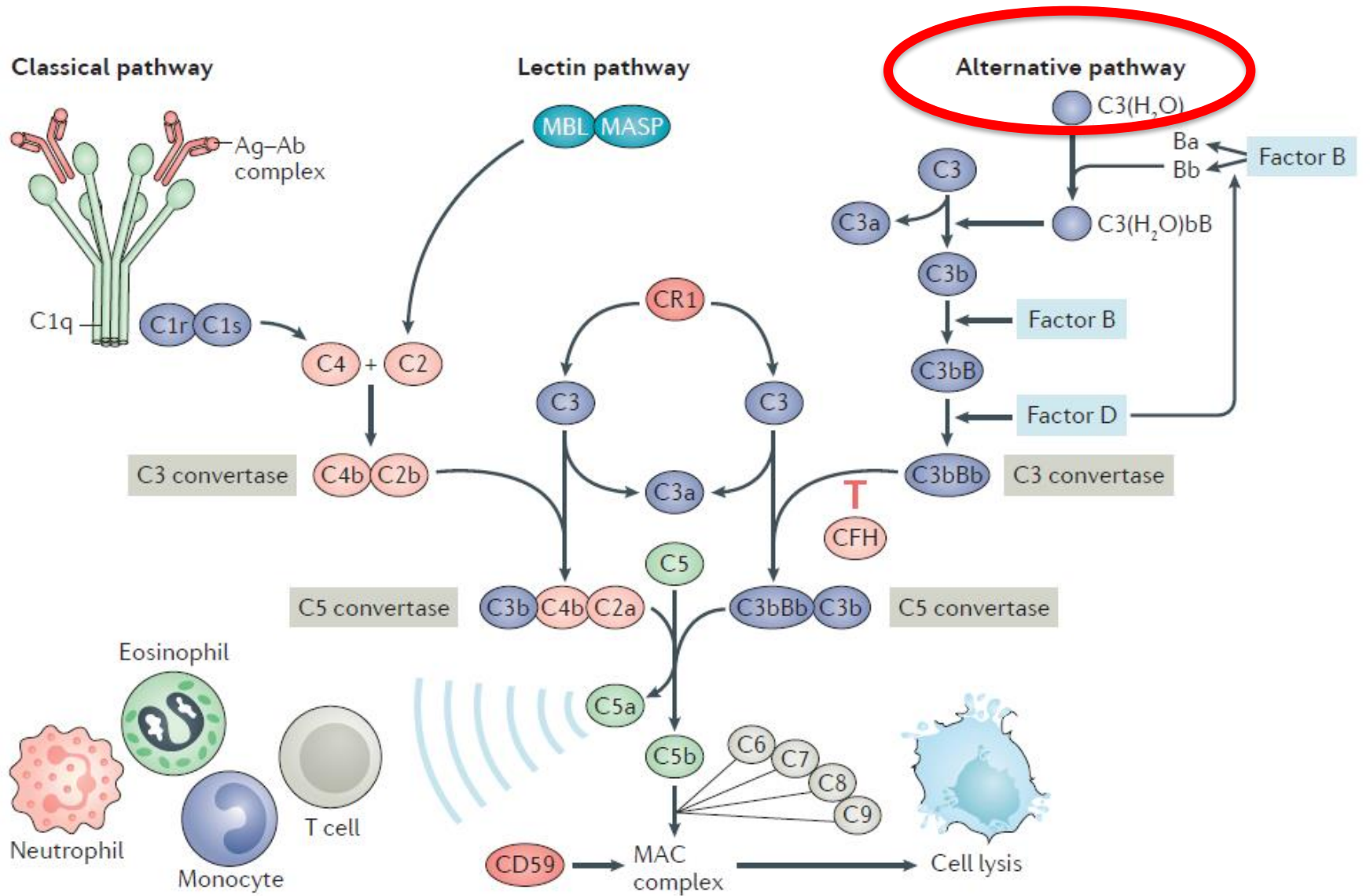
Entretien d'une réaction inflammatoire délétère médiée par les ANCA au cours des poussées



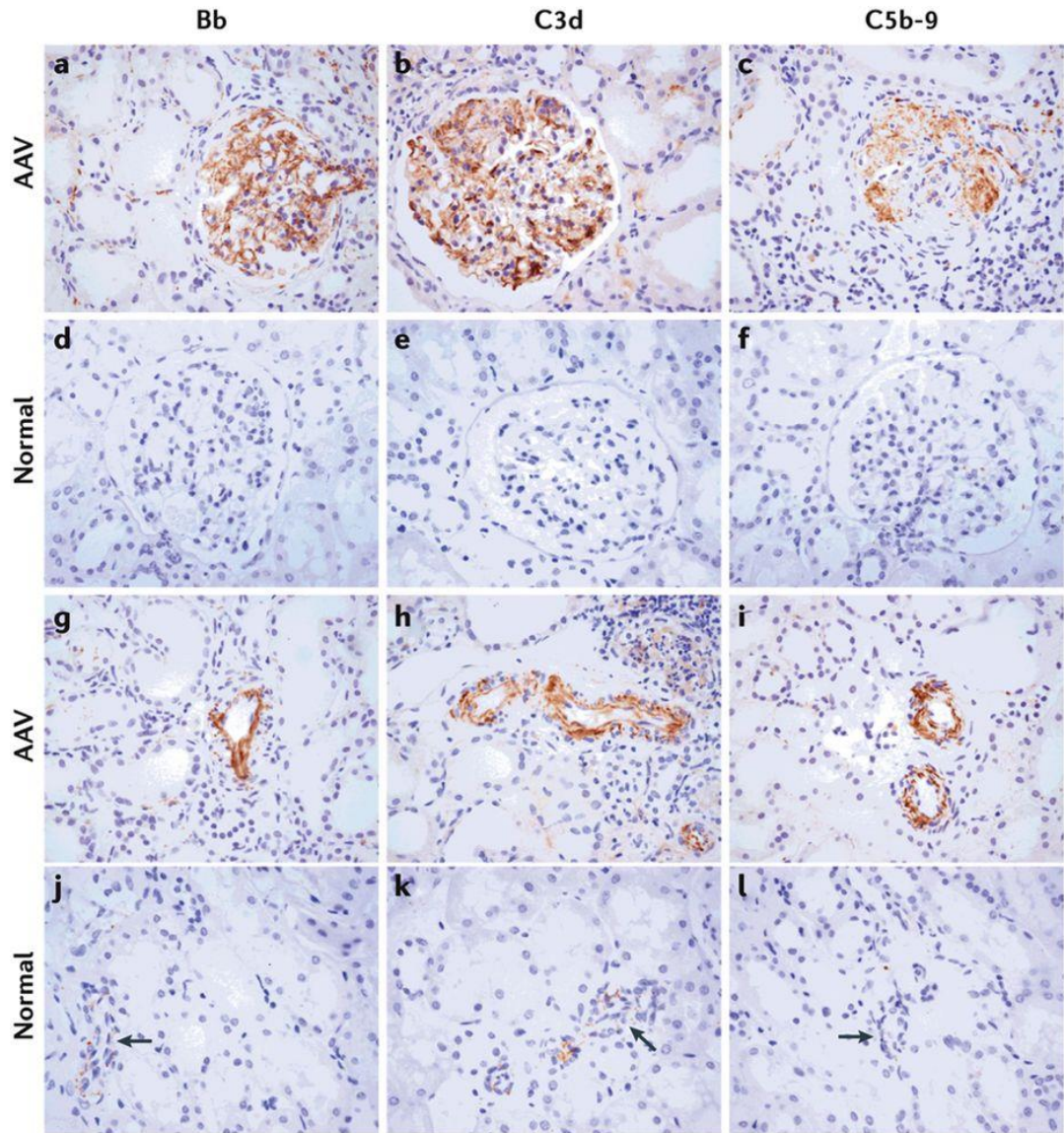
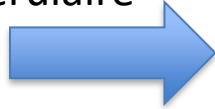
Dysfonctionnement de la régulation de la production des ANCA



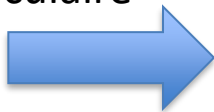
Rôle du Système du Complément

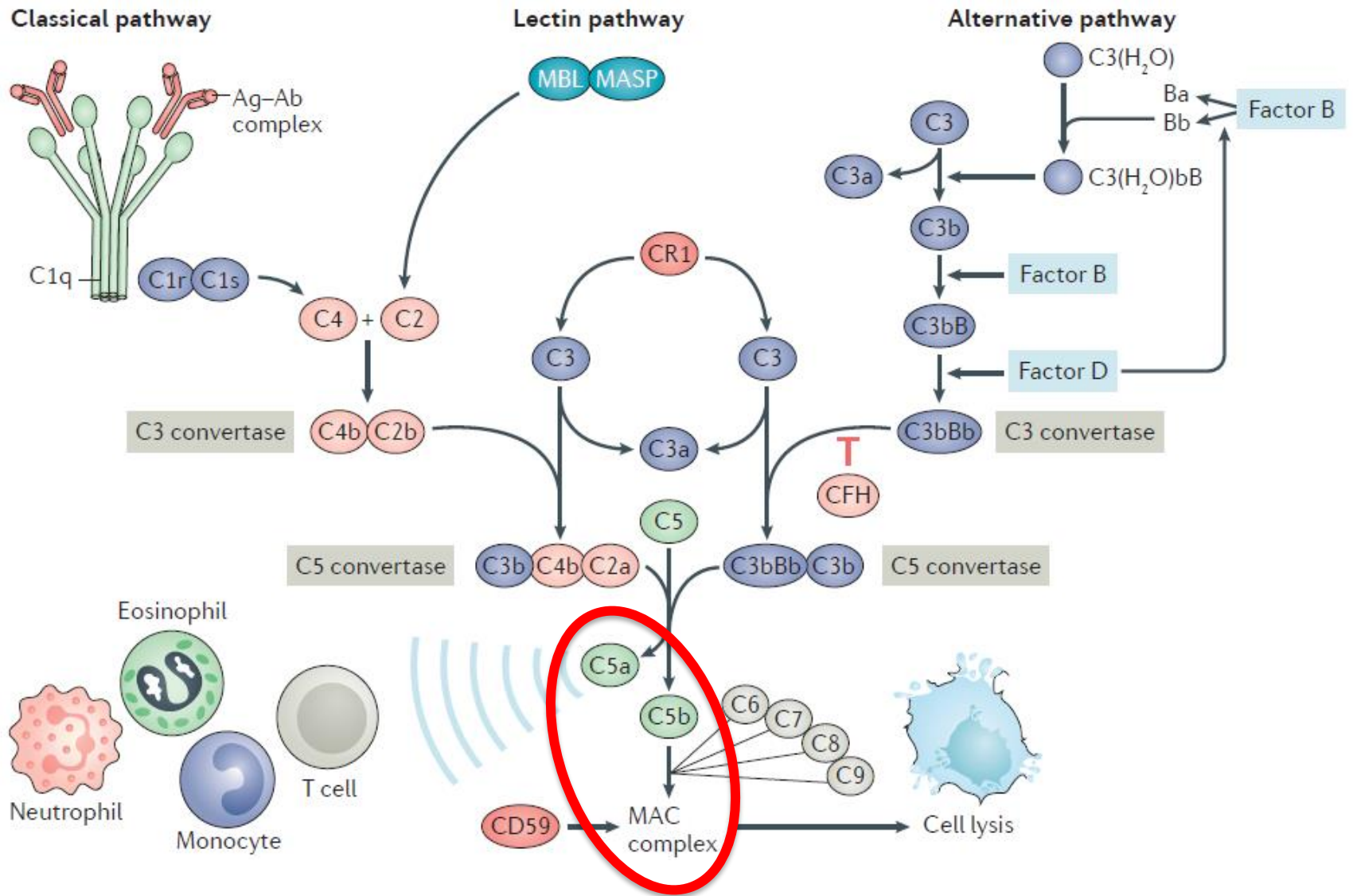


Marquage glomérulaire

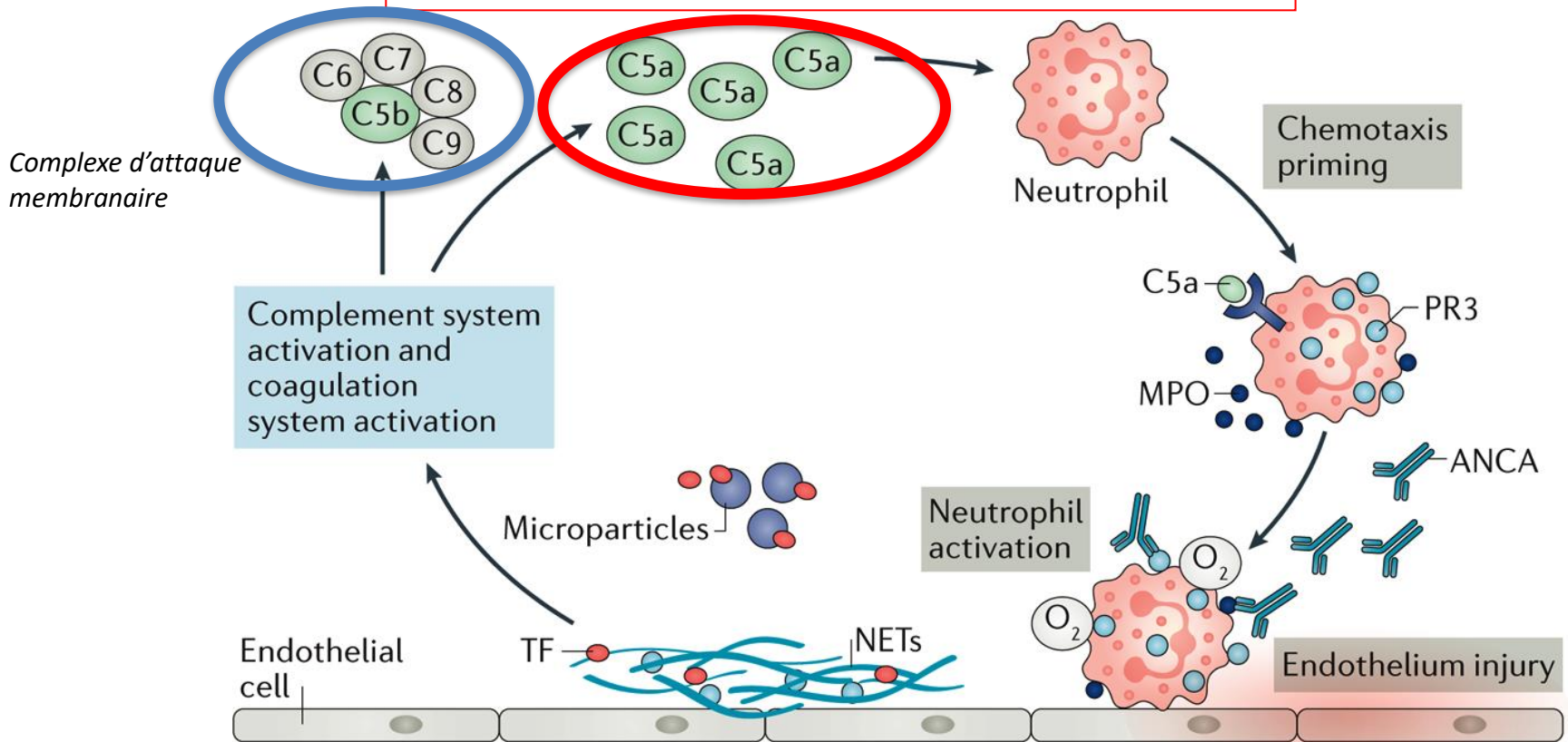


Marquage vasculaire





Boucle amplificatrice pro-inflammatoire par C5a



Prise en charge thérapeutique

Immunomodulation globale ou ciblée

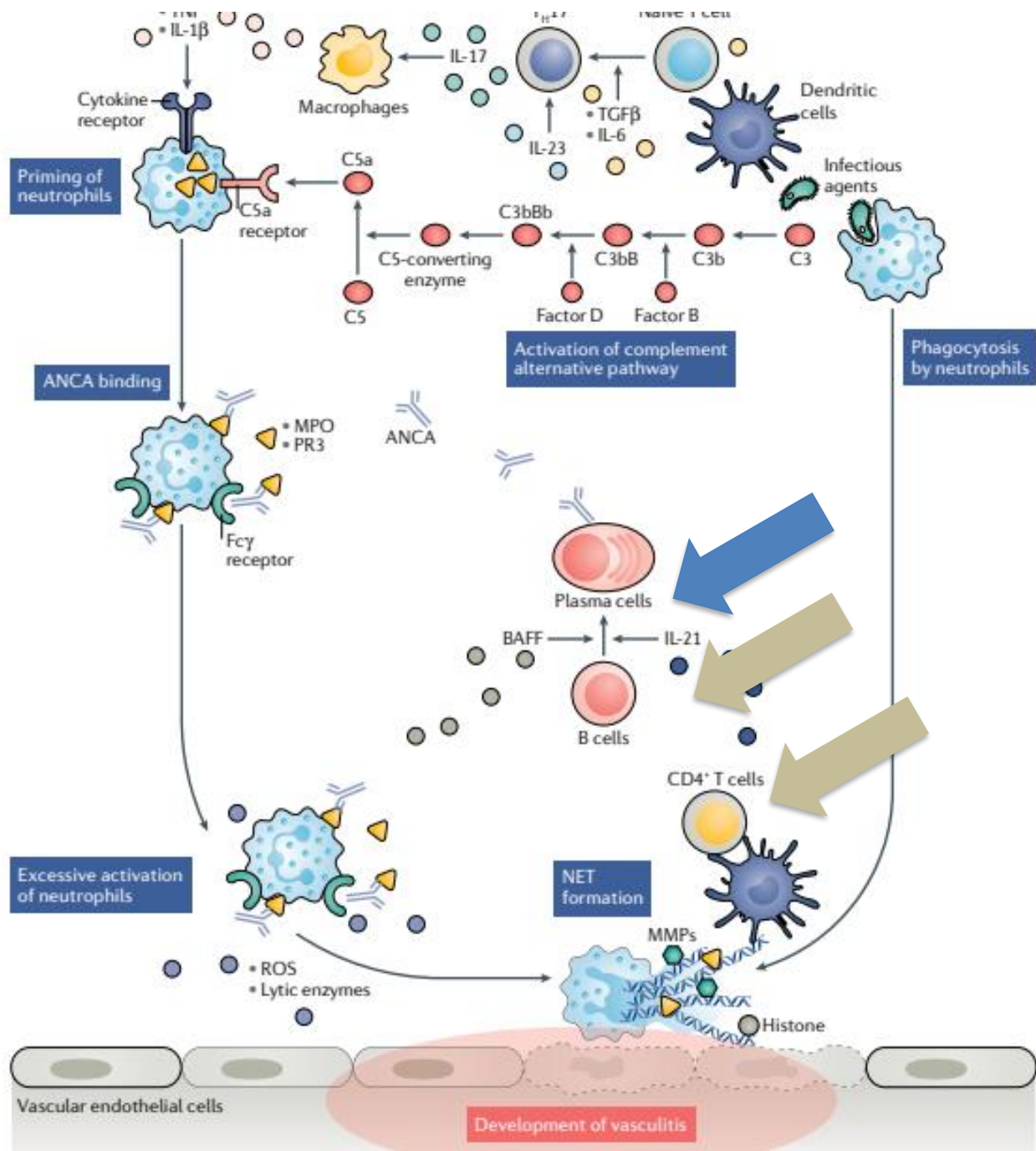
Objectifs thérapeutiques :

- 1- Limiter la réaction inflammatoire lors des poussées par un traitement symptomatique anti-inflammatoire**
- 2- Limiter la survenue de nouvelles poussées tout en palliant aux conséquences fonctionnelles des atteintes tissulaires par l'instauration d'un traitement d'entretien à visée immunomodulatrice**

Immunosuppresseurs

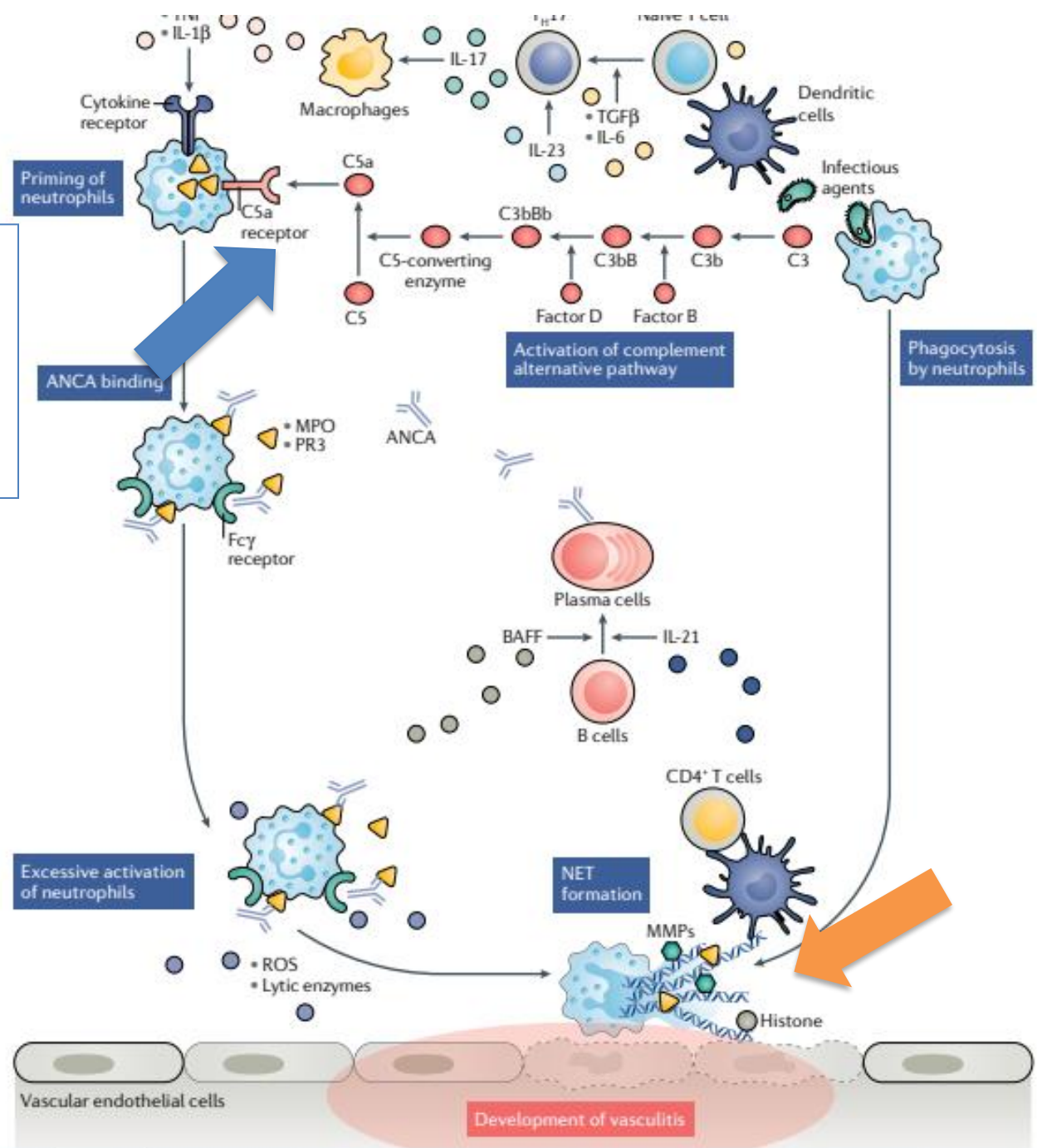
Cyclophosphamide
Azathioprine
+/- corticothérapie

**Traitements
biologiques ciblés**
Rituximab



Traitements biologiques ciblés
Système du Complément
Eculizumab (Ac anti-C5)
Avacopan (antagoniste C5R)

La nétose
Anti-PAD4



Traitements complémentaires

- **Immunoglobulines polyvalentes : diminution du risque infectieux**
- **Prophylaxie anti-infectieuse : triméthoprime-sulfaméthoxazol**
- **Vaccinations préconisées**
virus grippe, SARS CoV-2 et pneumocoque