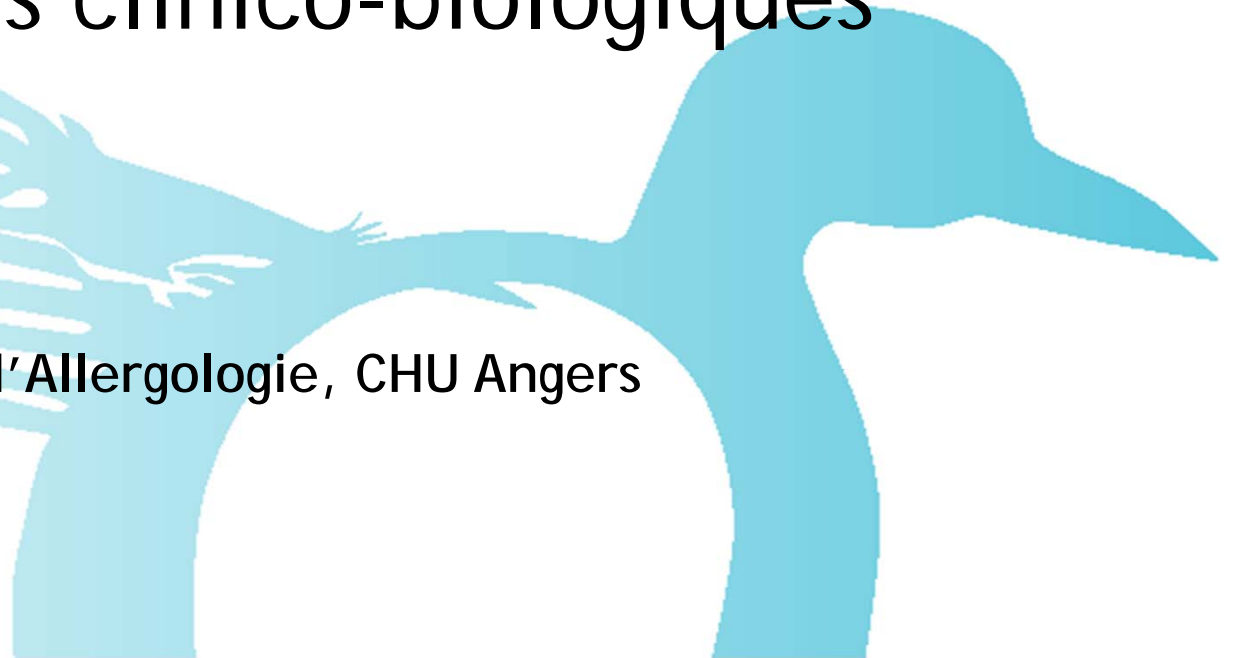


Maxime Boyer, Alain Chevailler

Les ANCA de spécificités autres qu'anti-protéinase 3 ou anti-myéloperoxydase :
corrélations clinico-biologiques

Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, CHU Angers
INSERM U892



ANCA / ACPN

- **A**nti-**N**eutrophil **C**ytoplasmic auto **A**ntibodies
- **A**nticorps anti-**C**ytoplasme des **P**olynucléaires **N**eutrophiles
- Auto-anticorps
- Cibles = enzymes des granules des PNN, des lysosomes des monocytes
- 1982: 1ère description par Davies et al. au cours de glomérulonéphrites nécrosantes (arbovirose?)
- 1985: Van der Woude et al. montrent association entre ANCA et Wegener
- Juin 2009 : en 21 ans
 - 4594 références
- ANCA Workshop :
 - 1er : Copenhague, mai 1988
 - 14ème : Copenhague, mai 2009

BEAUVILLAIN C, DELNESTE Y, RENIER G, JEANNIN P, SUBRA JF, CHEVAILLER A.
Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: how should the biologist manage them?
Clin Rev Allergy Immunol. 2008 35(1-2):47-58.



Contenu des granules des PNN

granules
primaires

granules
secondaires

granules
gélatinase

vésicules
sécrétoires

membrane
CD63, CD68
h-lamp-2

membrane
CD15, CD66, CD67
fMLP-R, CR-4

membrane
CR-4, fMLP-R

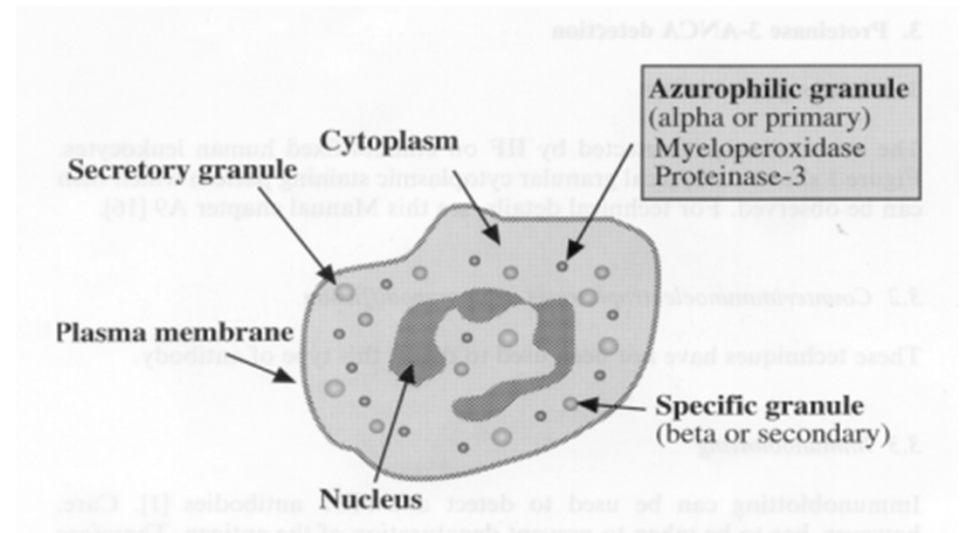
membrane
CR-1, fMLP-R
CD16, CD10

matrice
azurocidine
BPI
mannosidase
élastase
myéloperoxydase
protéinase 3
cathepsine G
lysosyme
glucuronidase

matrice
collagenase
lactoferrine
histaminase
héparanase
sialidase
Vit B₁₂ bp
plasminogène-
activateur
protéinase 3
lysosyme

matrice
gélatinase
lysozyme
acétyl-transferase
protéinase 3

matrice
protéines
plasmatisques



En bleu: cibles des ANCA
6^e COLLOQUE, Paris 2010

autres cibles antigéniques

Elastase : Nassberger : Lancet 1989, 1 : 509

β -glucuronidase: Nassberger : Lancet 1992, 340 : 734-735

Lactoferrine : Corremans, Arthritis Rheum , 1992, 35 : 1466-1475

Cathepsine G : Halbwachs-Mecarelli Clin Exp Immunol 1992, 90 :79-84

lysozyme : Schmitt, Adv Exp Med Biol, 1993, 336 : 267-272

alpha-énolase : Moodie, Kidney Int 1993, 43 : 675-681

h-lamp2 : Kain, J Exp Med, 1995, 181 : 585-591; Nat Med 2008, 14:1088

défensine : Gallin et al, J Exp Med, 1995, 182 : 41-47

BPI : Zhao : Clin Exp Immunol 1995, 99 : 49-56

azurocidine :Zhao : Clin Exp Immunol 1996, 103 : 397-402

HMG1, HMG2 : Sobajima et al, Clin Exp Immunol, 1997, 107 : 135-140



Problématique

- Les ANCA sont **des marqueurs sérologiques importants** pour le **diagnostic** et le **suivi** des patients atteints de vascularites nécrosantes primitives

- **Association établie pour:** cANCA **PR3** / Wegener

pANCA **MPO** / MPA

titre élevé

=> **Quel est l'intérêt clinique des cibles antigéniques mineures?**

(anti-BPI [anti-bactericidal Permeability increasing protein], anti-élastase, anti-lactoferrine et anti-cathepsine G)



Détection par IFI

- Sur PNN humains normaux fixés à l'éthanol, formol, méthanol et sur cellules HEP-2 (**Euroimmun®**)
- Sérum dilution au 1/20ème
- Anti-Ig humaines-FITC (anti Ig-G)
- Lecture au microscope à fluorescence avec immersion
- Résultats:
- cANCA (cytoplasmique)
- pANCA (périnucléaire)
- aANCA (atypique)
- Douteux : ⇔ ANCA profil

Aspect	Ethanol	Formol	Méthanol
cANCA	Cytoplasmique granuleuse	Cytoplasmique granuleuse	Cytoplasmique granuleuse
pANCA	Périnucléaire	Cytoplasmique granuleuse	Négatif
aANCA	Périnucléaire	Négatif/Cytoplasmique granuleuse	Périnucléaire
ANA	Nucléaire/Périnucléaire	Nucléaire/Périnucléaire/ Négatif	Nucléaire/Périnucléaire



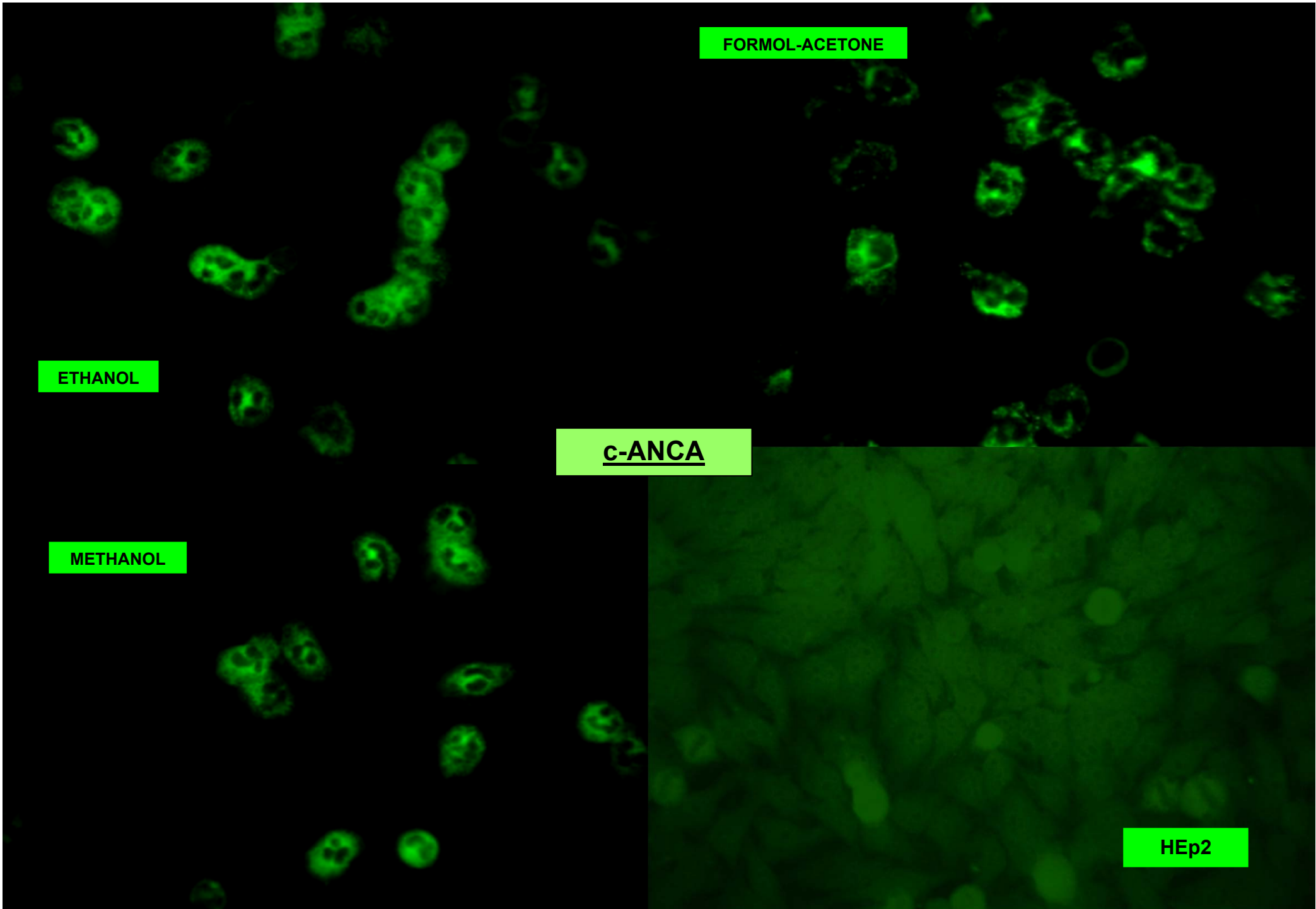
FORMOL-ACETONE

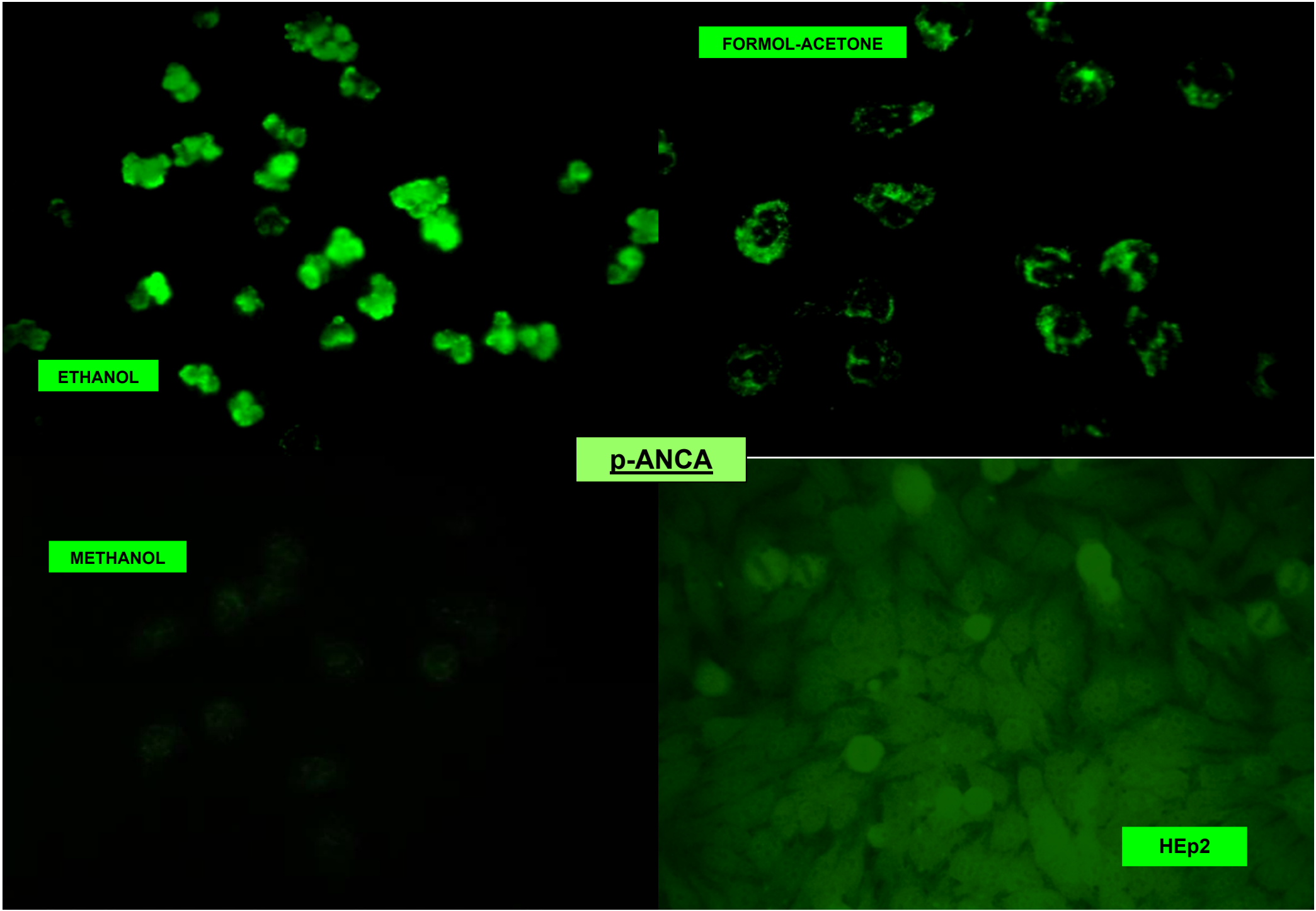
ETHANOL

METHANOL

c-ANCA

HEp2





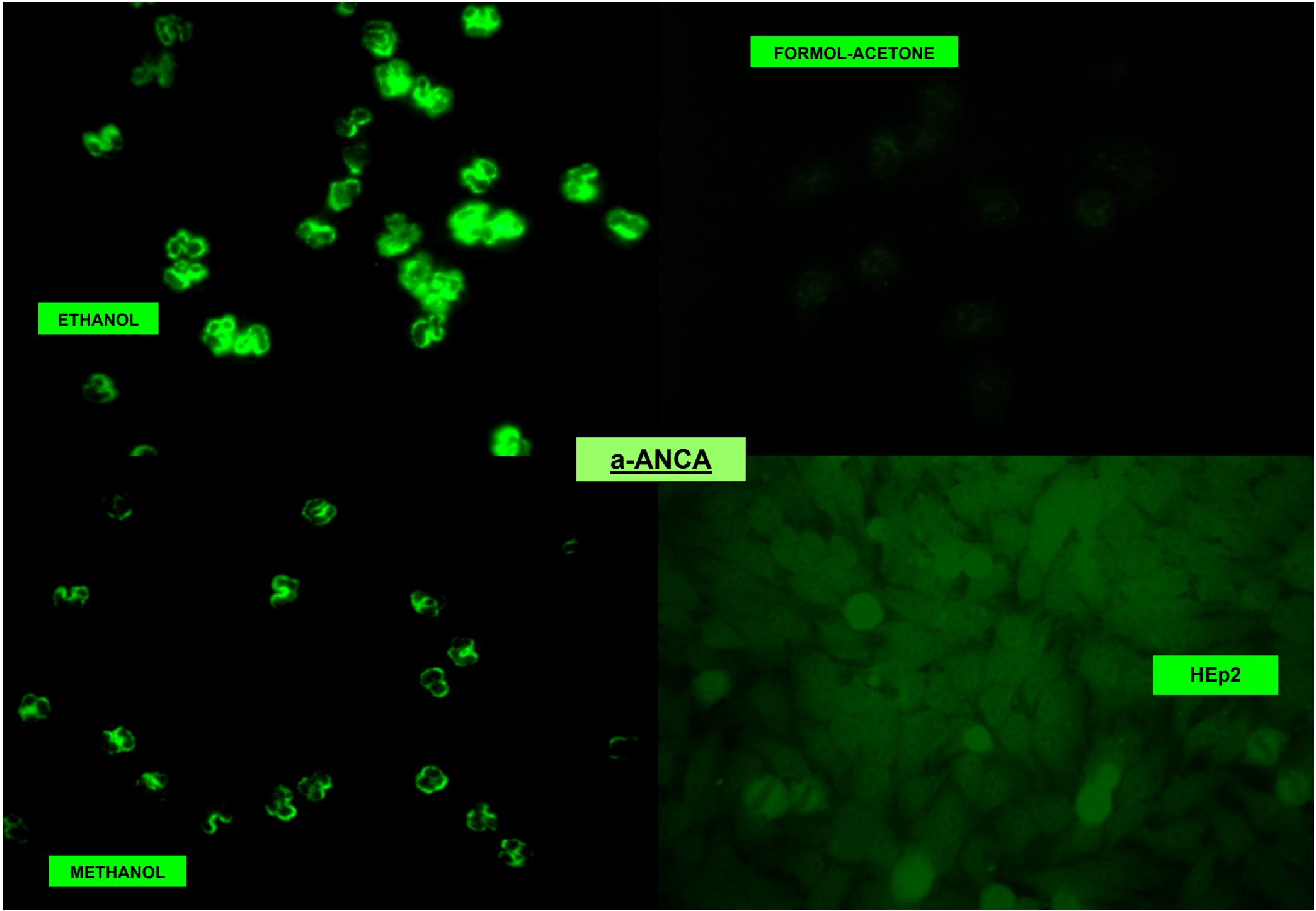
FORMOL-ACETONE

ETHANOL

p-ANCA

METHANOL

HEp2



FORMOL-ACETONE

ETHANOL

a-ANCA

HEp2

METHANOL

MATERIEL: CARACTERISATION DES ANCA

- Méthodes en phase solide
- - méthodes de type ELISA (ANCA profil, **Euroimmun**®) : PR-3, MPO, LF, EL, CG, BPI
- - méthodes de type ELISA unitaire
 - PR-3 (**Euroimmun** ®)
 - MPO (**Biorad**®) jusque en 2008; méthode fluorométrique de type ELIA (**Unicap**, **Phadia**®) à partir de 2008
- Méthodes en phase solide
 - Immunodot (**D-tek**®)
 - variant de l'ELISA: Ag fixé sur membrane de nitrocellulose
 - avantage: adapté à la recherche d'ANCA en urgence
 - Inconvénients : mêmes que pour l'ELISA :
 - structure conformationnelle
 - pureté
 - ne répond qu'à la question posée



étude

- 2001 – 2009 :
 - 438 sérums ANCA positifs en IFI
 - 73 anti-MPO, 32 anti-PR3, 1 double (MPO + PR3)
 - 259 ANCA profil négatifs
 - 154 aANCA, 78 cANCA, 27 pANCA
 - 73 spécificités autres que PR3 ou MPO, isolées ou associées



Données démographiques (1)

patients	73	
sexe	féminin	40
	masculin	33
âge moyen (années)	48,26	
écart type (années)	29,69	
âges extrêmes (années)	1 à 86	



Données démographiques (2)

Services	Nombre de patients	Services	Nombre de patients
Rhumatologie	3	Pédiatrie	9
Oncologie pédiatrique	3	Endocrinologie	4
Maladies infectieuses	4	Médecine interne	8
Dermatologie	2	Hépatogastroentérologie	6
Pneumologie	7	Neurologie	3
Néphrologie	7	CH voisins	17

hors contexte d'urgence : pas de réanimation



Données démographiques (3)

Age (années)	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80 et plus
Total	11	7	6	6	3	4	10	16	10
Hommes	6	1	1	4	2	3	7	6	4
Femmes	5	6	5	2	1	1	3	10	6

2 pics :

- < 20 ans : 18/73 (24,65%)
- > 60 ans : 36/73 (49,31%)



Spécificité selon l'aspect en IFI

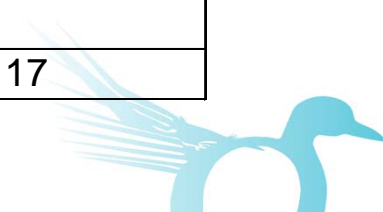
- 36 anti-BPI
- 19 anti-EL
- 15 anti-CG
- 12 anti-LF
- 56 monospécifiques
- 17 multispécifiques
- aANCA majoritaire :
 - 32/73 (44%)
- Sauf anti-BPI :
 - 50 % cANCA (13/26)

IFI	Cytoplasmique	Périnucléaire	Atypique	Total
ELISA				
BPI	13	4	9	26
cat G	3	1	4	8
EL	1	4	8	13
LF	1	3	5	9
EL+ LF	0	0	1	1
BPI + cat G + PR3	0	0	1	1
BPI + cat G	1	0	0	1
BPI + cat G + MPO	0	0	1	1
BPI + PR3	4	0	0	4
BPI + MPO	1	0	0	1
BPI + cat G + LF	0	0	1	1
BPI + cat G + EL + MPO + PR3	0	0	1	1
EL + MPO + PR3	0	1	0	1
LF + MPO	0	1	0	1
cat G + MPO	0	1	0	1
cat G + EL	1	0	0	1
EL + MPO	0	0	1	1
EL + PR3	1	0	0	1
Total	26	15	32	73



Spécificités et maladies (1)

Maladies	N	Homme	Femme	BPI	EL	CG	LF	Multi.spécifiques
Pulmonaires	12	5	7	5	2	1	1	3
Systémiques	11	3	8	5	0	3	3	0
Intestinales	10	4	6	4	0	2	1	3
Vascularitiques	9	5	4	3	1	0	0	5
Infectieuses	8	6	2	3	3	0	0	2
Inflammatoires rhumatismales	8	1	7	1	3	1	2	1
Hématologiques	5	4	1	1	1	1	1	1
Hépatiques	4	2	2	2	1	0	1	0
Rénales	3	2	1	2	1	0	0	0
Non classées	3	1	2	0	1	0	0	2
	73	33	40	26	13	8	9	17



Spécificités et maladies (2)

- Pulmonaires :
 - 5 fibroses
 - 5 pneumopathies
 - 1 néoplasie
 - 1 mucoviscidose
 - 5 anti-BPI
 - 2 anti-EL
 - 1 anti-CG
 - 1 anti-LF
 - 3 multispécifiques
- Systémiques :
 - 1 SAPL, 1 Behcet
 - 1 fièvre périodique
 - 1 indifférenciée
 - 2 LES, 2 DM, 2 GS
 - 5 anti-BPI
 - 0 anti-EL
 - 3 anti-CG
 - 2 anti-LF
 - 0 multispécifique



Spécificités et maladies (3)

- intestinales :
 - 4 RCUH
 - 3 Crohn
 - 3 MICI indifférenciés
 - 4 anti-BPI
 - 0 anti-EL
 - 2 anti-CG
 - 1 anti-LF
 - 3 multispécifiques
- vascularites :
 - 2 WG, 3 MPA
 - 1 angéite cérébrale
 - 1 indifférenciée
 - 1 vascularite rénale
 - 3 anti-BPI
 - 1 anti-EL
 - 0 anti-CG
 - 0 anti-LF
 - 5 multispécifiques



Spécificités et maladies (4)

- infectieuses :
 - 2 septicémie *S aureus*
 - 1 muco *P aeruginosa*
 - 1 endocardite, 1 abcès rénal
 - 1 HIV, 1 iléite bactérienne
 - 3 anti-BPI
 - 3 anti-EL
 - 0 anti-CG
 - 0 anti-LF
 - 2 multispécifiques
- Rhumatismes inflammatoires :
 - 4 ACJ, 1 SA
 - 1 arthrite
 - 1 chondrocalcinose
 - 1 polyarthralgies
 - 1 anti-BPI
 - 3 anti-EL
 - 1 anti-CG
 - 2 anti-LF
 - 1 multispécifique



Spécificités et maladies (5)

- hématologiques :
 - 2 LNH
 - 1 Wiskott Aldrich
 - 1PTI, 1 myélome
 - 1 neutropénie
 - 1 anti-BPI
 - 1 anti-EL
 - 1 anti-CG
 - 2 anti-LF
 - 1 multispécifique
- hépatiques :
 - 2 hépatites
 - 1 cirrhose
 - 1 overlap syndrome
 - 2 anti-BPI
 - 1 anti-EL
 - 0 anti-CG
 - 1 anti-LF
 - 0 multispécifique



Spécificités et maladies (6)

- rénales :
 - 1 IRA
 - 1 IRC
 - 1 Berger
 - 2 anti-BPI
 - 1 anti-EL
 - 0 anti-CG
 - 0 anti-LF
 - 0 multispécifique
- Non classés :
 - 1 purpura
 - 1 HTIC
 - 1 syndrome de Marshall
 - 1 polyarthralgies
 - 0 anti-BPI
 - 1 anti-EL
 - 0 anti-CG
 - 0 anti-LF
 - 2 multispécifiques



Spécificité et maladies (7)

- Anti-BPI :
 - **Les plus fréquents :**
 - 36 / 73 (49 %)
 - **Sous-estimés :**
 - 50 % IFI négatifs
 - Monospécifiques :
 - **50 % cANCA**
 - 45 % connectivites
 - 42 % maladie pulmonaire
 - 40 % MICI
 - 37 % infections
- Anti-élastase :
 - 19 / 73 (26 %)
 - Principalement **aANCA**
 - Monospécifiques :
 - 42 % maladie pulmonaire
 - **37 % rhumatisme inflammatoire**
 - 25 % infections



Spécificité et maladies (8)

- Anti-cathepsine G :
 - 15 / 73 (21 %)
 - Principalement **aANCA**
 - Monospécifiques :
 - 27 % connectivites
 - 27 % MICI
- Anti-lactoferrine :
 - 19 / 73 (26 %)
 - Principalement **aANCA**
 - Monospécifiques :
 - 27 % connectivites
 - 27 % rhumatismes inflammatoires



Spécificité et maladies (9)

- Multi-spécifiques
 - 17 / 73 (23 %)
 - 2 maladies de Wegener (PR3 +BPI)
 - 2 microplyangéites (MPO + LF ou CG)
 - 3 MICI (BPI, CG, LF)
 - 1 mucoviscidose colonisée par *P Aeruginosa*
 - BPI + MPO + CG
 - 1 endocardite :
 - BPI + CG + LF

Subra J.F., Michelet C., Laporte J., Carrere F., Reboul P., Cartier F., Saint-Andre J.P., Chevailler A.
Clin. Nephrol. 1998 49, 15-18.



COMPARAISON

Angers 2009

- monocentrique
- 73 patients
- 36 anti-BPI (36%)
- 19 anti-élastase
- 15 anti-cathepsine G
- 12 anti-lactoferrine
- 17 multispécifiques

⇒ connectivites (11 cas) (15%)
MICI (10 cas) (14%)
pulmonaires (12cas) (16%)
infectieuses (8 cas) (11%)
vascularites (9 cas) (12%)

Prague 2003 (11 ème ANCA Workshop)

- multacentrique (GEAI)
- 28 patients:
• 13 anti-BPI (46%)
- 6 anti-élastase
- 5 anti-cathepsine G
- 3 anti-lactoferrine
- 1 anti-BPI + lactoferrine

⇒ MICI (5 cas) 18%
infectieuses (5 cas) 18%
vascularites (0 cas) 0%



[Talor MV](#), [Stone JH](#), [Stebbing J](#), et al., Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Clin Exp Immunol 2007;150:42-8.

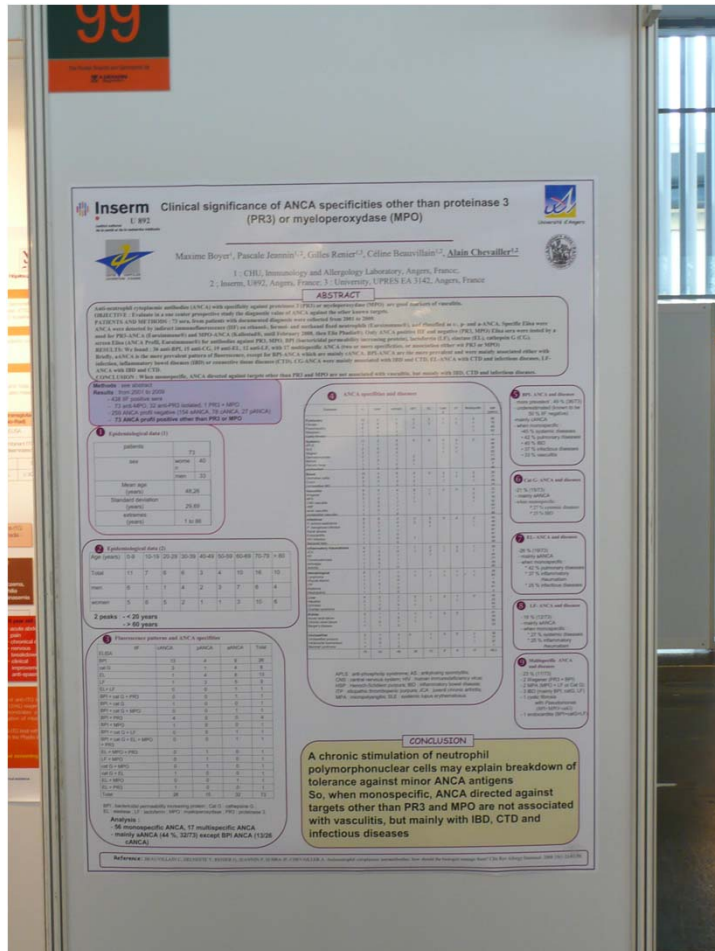
- 62 patients
- Point de départ **clinique**
- **35 % ANCA monospécifiques**
- Antigènes mineurs : préférentiellement non vascularites
 - 22 / 36 anti-CG
 - 12 / 22 anti-BPI
 - 6 / 10 anti- EL
 - 10 / 20 anti-LF





7th INTERNATIONAL CONGRESS ON **AUTOIMMUNITY** LJUBLJANA, SLOVENIA MAY 5 - 9, 2010

141 : Clinical relevance of ANCA to one or more Targets. *B Bonaci-Nikolic, S Andredejevic*
76 patients, ANCA profil à 7 (lysozyme en plus)



maladies	nombre	monospécifique	ANCA	
			2	> 2
vascularites	29	26	1	2
PTU	10	4	4	2
infection	10	8	1	1
MICI	19	8	8	3
atres	6	2	2	2
total	76	48	16	10

ANCA monospécifiques :
principalement MPO (25), PR3 (15)
ANCA multispécifiques :
autres cibles
pas vascularites
bon pronostic

6^e COLLOQUE, Paris 2010



Conclusion

- ANCA anti-Ag mineurs, monospécifique ou multispécifique non MPO ou PR3 :
 - Pas vascularite
 - MICI, connectivite, infection
- Stimulation chronique des PNN :
 - Relargage contenu des granules
 - Contexte cytokinique \Rightarrow rupture de tolérance



Remerciements



- Maxime Boyer



- Pascale Jeannin
- Céline Beauvillain
- Gilles Renier
- Yves Delneste
- Jean-François Subra

- Rachel Boivinet
- Catherine Daniel
- Christine Deau
- Anne-Marie-Royer

Et tous les cliniciens du CHU
Et les biologistes et cliniciens des CH de
Saint-Nazaire
La Roche sur Yon

