

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DE BLIDA I**

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE**



Mémoire de Fin d'Etude en vue de l'obtention  
Du diplôme de Master en Science de la Nature et de la Vie

**Option : Biosignalisation cellulaire et moléculaire: Immunologie**

**Thème :**

**Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaire :**

**Etude comparative entre deux techniques : Immunofluorescence indirecte et  
ELISA.**

Présenté par :

TAIBI Amina

**Devant le jury composé de :**

M <sup>f</sup> BENYAHIA. N	Maitre assistant A (USDB)	Président
M <sup>me</sup> AISSANI. R	Maitre assistante A (USDB)	Examinatrice
M <sup>me</sup> ALLAM. I	Maître assistante A (CHU Beni-Messous)	Promotrice
M <sup>f</sup> Khelfi. A	Enseignant chercheur (USTHB)	Co-promoteur

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2015/2016**

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements à notre bon Dieu de m'avoir donné la puissance pour accomplir ce travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements envers ma promotrice Dr ALLAM.I, d'avoir accepté de m'encadrer et surtout pour sa patience, sa disponibilité et ses judicieux conseils.

Je tiens à remercier mon co-promoteur Mr Khelfi,A pour son aide, sa méthodologie et ses conseils de rédaction qui m'ont toujours servi durant la réalisation de ce travail.

Je voudrais remercier tout particulièrement Dahmani,N , Bourai,H et Bouhbila,H. qui m'ont dirigé tout au long de mon stage, elles ont toujours été disponibles et à l'écoute de mes nombreuses questions.

Je tiens aussi à remercier le chef de service d'immunologie médicale du centre hospitalo-universitaire « ISSAD HASSANI » de Beni Messous le Pr Djidjik qui a accepté de m'accueillir en stage.

Je souhaite remercier tout le personnel de service d'immunologie médicale, au sein duquel j'ai effectué ce mémoire.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers : ma tante Dalila, Samira, El-Hadi, Asma, Sara, Ibtissem, ma chère cousine Imene et tous les amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Je tiens également à remercier les membres de jury : Mr Benyahia.N pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire et Mme Aissani.R pour avoir consacré du temps à la lecture de ce mémoire en tant qu'examinatrice.

# Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes parents,

À qui je leur dois mon éducation, je prie Dieu pour les protéger et les garder pour moi

Mon cher frère Amine et mon adorable sœur Sara

Ma grand-mère

Toutes mes tantes et mes oncles

Mes cousines que j'adore

À toute ma famille

Toutes mes amies particulièrement Madina et Ibtissem

Tous mes camarades de promotion Master II 2015-2016.

Les maladies auto-immunes systémiques sont caractérisées par des auto-anticorps anti-nucléaires (ANA), leur détection et leur caractérisation sont des étapes déterminantes devant toute manifestation clinique évoquant cette pathologie, d'où le but de notre étude qui visait à rechercher les auto-anticorps anti-nucléaires par deux techniques: la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) et la technique d'ELISA, et les comparer selon la sensibilité de chacune.

Cette étude a concerné 90 femmes (76%) et 29 hommes (24%), avec un sexe ratio de 3/1. La moyenne d'âge dans notre série était de 44,06 ( $\pm 17,83$ ) ans. La tranche d'âge la plus touchée par les maladies auto-immunes systémiques était comprise entre 40 et 50 ans.

Les résultats de la recherche des auto-anticorps anti-nucléaires ont révélé que sur les 119 patients atteints d'une maladie auto-immune systémique, 73% étaient positifs en ELISA alors que 50% étaient positifs en IFI. L'analyse des résultats de la recherche des ANA chez les patients ayant des résultats positifs en IFI et ELISA a montré qu'il y a une bonne concordance entre le signal enzymatique et le titre de l'IFI. Sur les 31% des patients avec des ANA positifs en ELISA et négatifs en IFI, 68% avaient des ratios faiblement positifs ce qui explique l'extrême sensibilité de la technique. Alors que le pourcentage des patients avec des ANA positifs en IFI et négatifs en ELISA était de 78% avec un seuil de 1/80.

En conclusion, notre travail a montré que la technique d'ELISA est plus sensible que l'IFI mais il serait intéressant de revoir les seuils de positivité des deux techniques : (Titre > 1/80, ratio > 1).

**Mots clés :** Maladie auto-immune systémique, ANA, ELISA, IFI, sensibilité.

## Summary

Autoimmune diseases (AID) are the result of a deregulation of the immune system leading to an inadequate immunological response of the body against the self-antigens to the origin of a disease process. They are classified into two types: the specific organ autoimmune diseases and non-specific ones which are also called systematic. Most systemic autoimmune diseases are characterized by antinuclear auto antibodies (ANA), their detection and characterization are key steps before any clinical evidence suggesting this disease, hence, the purpose of our study is to look for anti-nuclear auto antibodies using two techniques: the indirect immunofluorescence technique (IFI) and the Elisa technique, and compare them as per the sensitivity of each.

This study involves 90 women (76%) and 29 men (24%), with a sex ratio of 3/1. The average age in our series was 44,06 ( $\pm$  17.83) years. The age group most affected by systemic autoimmune diseases is between 40 and 50 years.

The research results of antinuclear auto antibodies revealed that of the 119 patients with systemic autoimmune disease, 73% were positive by ELISA and 50% were positive by IFI. The analysis of the research results of ANA in patients with positive results in IFI and Elisa has shown that there is good correspondence (match) between the enzymatic signal and the title of the IFI. Of the 31% of patients with positive ANA in Elisa and negative in IFI, 68% had low positive ratios which explains the extreme sensitivity of the technique. While the prevalence of patients with positive ANA in IIF and negatives in Elisa was 78% with a threshold of 1/80.

In conclusion, our work has shown that the technique of ELISA is more sensitive than IFI, but it would be interesting to review the thresholds of both techniques.

Keywords: systemic autoimmune disease, anti-nuclear autoantibodies, Elisa immunological technique, indirect immunofluorescence technique, sensitivity.

## الملخص

تتميز معظم أمراض المناعة الذاتية النظامية من قبل الأجسام المضادة للنواة، وكشف وتوصيف خطوات أساسية قبل أي دليل سريري يشير هذا المرض، وبالتالي فإن الغرض من دراستنا الأجسام المضادة للنواة من قبل اثنين من التقنيات: تقنية المناعي غير المباشرة وتقنية إيليسا، ومقارنة لحساسية لكل منهما.

وتتضمن هذه الدراسة 90 امرأة (76%) و 29 من الرجال (24%)، وبلغت نسبة الجنس 1/3. وكان متوسط العمر في سلسلة لدينا 44,06 (± 17.83) سنة. الفئة العمرية الأكثر تضررا من أمراض المناعة الذاتية العامة ما بين 40 و 50 عاما.

كشفت نتائج البحوث من الأجسام المضادة للنواة أن من 119 المرضى الذين يعانون من أمراض المناعة الذاتية النظامية، 73% كانت إيجابية بواسطة ELISA و 50% كانت إيجابية من قبل معهد التمويل الدولي. وقد أظهرت تحليل نتائج البحوث في المرضى الذين يعانون من النتائج الإيجابية IFI و ELISA أن هناك توافقا جيدا بين إشارة الأنزيمية وعنوان IFI من 31% من المرضى الذين يعانون من الإيجابي ANA ELISA و IFI السلبى، كان 68% نسب إيجابية منخفضة وهو ما يفسر الحساسية المفرطة للتقنية. في حين كانت نسبة المرضى الذين يعانون من الإيجابي ANA الى إيليسا 78% مع عتبة 80/1.

في الختام، وقد أظهرت عملنا أن الأسلوب هو أكثر حساسية من ELISA ولكن سيكون من المثير للاهتمام أن مراجعة كل عتبات الإيجابية التقنية.

**كلمات البحث:** أمراض جهازية المناعة الذاتية، الأجسام المضادة للنواة ، إيليسا تقنية المناعية، تقنية المناعي غير المباشرة، والحساسية.

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b> : Induction des auto-anticorps par des antigènes cross-réactifs .....	7
<b>Figure 2</b> : Principe du mimétisme moléculaire appliqué dans une infection par CV-B4 .....	8
<b>Figure 3</b> : Mécanismes d'induction des réponses auto-immunes .....	9
<b>Figure 4</b> : Conduite à tenir devant la mise en évidence des AAN.....	12
<b>Figure 5</b> : Témoin négatif.....	18
<b>Figure 6</b> : Aspect homogène.....	18
<b>Figure 7</b> : Aspect moucheté.....	19
<b>Figure 8</b> : Aspect nucléolaire.....	19
<b>Figure 9</b> : Aspect centromère.....	20
<b>Figure 10</b> : Représentation de la répartition des patients selon leur sexe.....	23
<b>Figure 11</b> : Répartition des malades selon l'âge.....	24
<b>Figure 12</b> : Répartition des résultats en fonction de la positivité et la négativité des deux techniques : IFI et ELISA.....	24
<b>Figure 13</b> : Résultats de la recherche des auto-anticorps anti-nucléaires par ELISA (IFI -)..	27
<b>Figure 14</b> : Résultats de la recherche des auto-anticorps anti-nucléaires par IFI (ELISA -)..	28

## Liste des tableaux :

**Tableau I** : Maladies auto-immunes et anticorps mis en jeu .....5

**Tableau II** : Principaux autoanticorps/techniques de recherche/maladies associée.....14

**Tableau III** : Concordance entre les résultats de l'IFI et l'ELISA (Titre Vs Ratio.....26

**Tableau IV** : Représentation de la population étudiée avec les résultats de la recherche des ANA par la technique d'IFI et Elisa.



## Liste des abréviations :

AAN: Auto-anticorps anti-nucléaire.

ANCA: Auto-anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles.

Ac anti-ENA : Auto-anticorps anti-antigènes nucléaires solubles.

EGPA : Granulomatose éosinophilie avec polyangéite.

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

GPA : Granulomatose avec polyangéite.

Hep-2 : Cellule épithéliale humaine.

IFI : Immunofluorescence indirecte.

LES : Lupus érythémateux systémique.

MAI : Maladie auto-immune.

MPA : Polyangéite microscopique.

SAPL : Syndrome des anti-phospholipides.

ScS : Syndrome de Churg-Strauss.

TSH : Thyroestimuline.

# SOMMAIRE

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b><i>Chapitre I : Rappels bibliographiques</i></b>	
<b>I. Maladies auto-immunes .....</b>	<b>2</b>
<b>I-1 Historique .....</b>	<b>2</b>
<b>I-2 Définition .....</b>	<b>2</b>
<b>I-3 Epidémiologie .....</b>	<b>3</b>
<b>I-4 Classification des maladies auto-immunes .....</b>	<b>3</b>
<b>I-5 Etiologie des maladies auto-immunes .....</b>	<b>6</b>
I-5-1 Facteurs génétiques .....	6
I-5-2 Facteurs environnementaux.....	6
<b>I-6 Mécanismes de l'auto-immunisation .....</b>	<b>7</b>
<b>II. Auto-anticorps .....</b>	<b>10</b>
<b>II. 1 Auto-anticorps antinucléaires .....</b>	<b>10</b>
<b>II-2 Dépistage des auto-anticorps antinucléaires .....</b>	<b>12</b>
II-2-1 L'étape de dépistage .....	13
II-2-2 L'étape d'identification .....	13
<b><i>Chapitre II : Matériel et méthodes</i></b>	
<b>II.1 Matériel biologique .....</b>	<b>15</b>
<b>II.1.1 Echantillonnage .....</b>	<b>15</b>
<b>II.1.2 Prélèvement .....</b>	<b>15</b>
<b>II.2 Matériels non biologiques .....</b>	<b>15</b>
<b>II.3 Méthodes .....</b>	<b>16</b>
<b>II.3.1 Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires par IFI .....</b>	<b>16</b>
II.3.1.1 Principe .....	16
II.3.1.2 Mode opératoire .....	16

II-3-1-2-1 Préparation des réactifs .....	16
II-3-1-2-2 Exécution du test .....	17
II-3-1-3 Interprétation des résultats .....	18
II-3-2 Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires par ELISA .....	20
II-3-2-1 Principe .....	20
II-3-2-2 Mode opératoire .....	20
II-3-2-3 Interprétation des résultats .....	21

### ***Chapitre III : Résultats et discussion***

<b>III. 1 Echantillonnage .....</b>	<b>23</b>
III.1.1 Répartition selon le sexe .....	23
III.1.2 Répartition selon l'âge .....	23
<b>III. 2 Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires .....</b>	<b>24</b>
<b>III.2.1 Sensibilité IFI / ELISA .....</b>	<b>24</b>
III.2.1.1 ELISA+ / IFI + .....	26
III.2.1.2 Elisa + / IFI - .....	26
III.2.1.3 ELISA - / IFI + .....	27
<b>Conclusion .....</b>	<b>29</b>

#### **Références bibliographiques**

#### **Annexes**

Une maladie auto-immune (MAI) se définit par l'activation du système immunitaire du patient contre ses propres antigènes et provoque un dommage structurel ou fonctionnel des tissus ou des organes (**Chyderiotis et al., 2003**).

La physiopathologie des MAI est mal définie. Des facteurs génétiques, immunologiques, hormonaux et environnementaux peuvent jouer un rôle dans l'apparition et le développement de ces pathologies (**Kaux et al., 2008**). Des manifestations auto-immunes sont la conséquence d'un défaut de vigilance et de contrôle du système immunitaire. Il peut s'agir d'un déficit quantitatif ou qualitatif de certaines populations de lymphocytes dont le rôle est de réguler le système immunitaire (les lymphocytes T régulateurs ou Treg) (**Graham et al., 2006**).

Sur un plan clinique, on classe habituellement les MAI en deux groupes : les maladies auto-immunes spécifiques d'organes caractérisées par des lésions limitées à un tissu, à l'opposé des maladies auto-immunes systémiques qui provoquent des lésions bien plus étendues impliquant plusieurs organes (**Kuek et al., 2007**). La plupart des maladies auto-immunes systémiques sont caractérisées par des auto-anticorps dont la valeur diagnostique (spécificité et sensibilité) est variable mais peuvent avoir une valeur pronostique. Les principaux anticorps, sont les auto-anticorps antinucléaires (ANA) (**Sibilia, 2012**). Deux méthodes sont habituellement utilisées pour rechercher les auto-anticorps anti-nucléaires (**Petitpierre et al., 2009**). La première est une immunofluorescence sur des frottis de cellules Hep-2 (cellules de carcinome laryngé humain) qui permet de détecter les ANA. En cas de dépistage positif, la spécificité antigénique de ces auto-anticorps doit être déterminée par une méthode complémentaire (tests immuno-enzymatiques et radio-immunologiques). Quant à la deuxième méthode, elle consiste à utiliser la technique d'ELISA qui dans sa finalité aboutit au même but que la précédente. **Terrier et Mouthon (2014)**

Dans le cadre de ce travail réalisé au niveau de l'hôpital ISSAD Hassani de Beni Messous, on a recherché des auto-anticorps anti-nucléaires par deux techniques : Immunofluorescence indirecte (IFI) et ELISA chez 119 patients atteints d'une maladie auto-immune systémique, et on a réalisé une comparaison de ces deux techniques de dépistage en terme de sensibilité.

## I. Maladies auto-immunes :

### I-1 Historique :

Avant 1900, on pensait qu'une réaction immunitaire d'un individu contre ses propres constituants était impossible et qu'un antigène était obligatoirement étranger. Ensuite, au début du 20<sup>ème</sup> Siècle, Karl Landsteiner, un biologiste autrichien, découvre l'existence des groupes sanguins ; on comprend alors pourquoi certaines transfusions sanguines se soldent par un échec. Dans la même période, en 1904, Donath et Landsteiner ont découvert que l'auto-immunité est à l'origine d'une maladie des globules rouges, l'anémie hémolytique. La seconde maladie qui a été expliquée par un phénomène auto-immun est la thyroïdite. Un biologiste anglais, Ivan Roitt a mis en évidence en 1956 des auto-anticorps contre la thyroglobuline, une des hormones thyroïdiennes. Ensuite sont venues les prises de conscience sur le caractère auto-immun du lupus érythémateux disséminé, de la polyarthrite rhumatoïde et de bien d'autres maladies (Youinou et al., 2014).

### I-2 Définition :

Les maladies auto-immunes (MAI) sont la conséquence d'une dérégulation du système immunitaire entraînant une réponse immunitaire inadaptée de l'organisme contre les antigènes du soi (auto-antigènes) à l'origine d'un processus pathologique (Bach et Chatenoud, 2012). Les lymphocytes T et B auto-réactifs entraînent la destruction des propres constituants de l'individu via plusieurs mécanismes, soit directement par les lymphocytes T cytotoxiques et les dépôts d'anticorps activant le système du complément, soit indirectement via l'activation d'autres cellules impliquées dans la réponse inflammatoire (Mackay et Von Andrian, 2000).

## I-3 Epidémiologie :

Les maladies auto-immunes constituent aujourd'hui la 3<sup>ème</sup> cause de morbidité dans le monde après les maladies cardiovasculaires et les cancers (**Kaux et al., 2008**). Elles touchent entre 6 à 10 % de la population mondiale et concernant les femmes dans presque 80 % des cas. Au total près d'une femme sur dix en est ou en sera atteinte (**Roitt et Rabson, 2002**).

## I-4 Classification des maladies auto-immunes :

La classification des maladies auto-immunes est délicate et incertaine, car on ne comprend pas tous les mécanismes déclenchant ces maladies. Sur un plan clinique, on classe habituellement les maladies auto-immunes en deux groupes ; les maladies auto-immunes spécifiques d'organes caractérisées par des lésions limitées à un tissu, à l'opposé des maladies auto-immunes systémiques, caractérisées par des lésions bien plus étendues (**Kuek et al., 2007**).

### - Maladies auto-immunes spécifiques d'organe (**Tableau I**) :

Les mécanismes d'action dans les MAI spécifiques d'organe sont variés, faisant appel à l'immunité humorale et/ou cellulaire aboutissant à la destruction ou la dysfonction d'un tissu ou d'un organe cible. Les organes cibles sont le plus fréquemment les glandes endocrines, les éléments figurés du sang, le tissu conjonctif (peau essentiellement) et le système nerveux.

Il peut s'agir d'une insuffisance de fonctionnement d'un organe, notamment d'une glande endocrine comme dans la thyroïdite d'Hashimoto (hypothyroïdie par destruction du tissu thyroïdien) ou d'une stimulation de sa fonction comme dans la thyroïdite de Basedow (hyperthyroïdie par stimulation excessive des récepteurs du TSH, une hormone stimulant la sécrétion des hormones thyroïdiennes) (**Nagamine et al., 1997**).

### - Maladies auto-immunes systémiques (**Tableau I**) :

Dans les MAI systémiques, les mécanismes mis en jeu sont souvent plus complexes et les mécanismes lésionnels peuvent différer en fonction de l'organe touché. En effet, on ne retrouve pas une cible antigénique unique comme c'est le cas des MAI spécifiques d'organe (**Jennette et al., 1994**).

Parmi ces MAI non spécifiques d'organe, on distingue :

- Le groupe des vascularites systémiques : le processus auto-immun dans ce cas touche la paroi des vaisseaux et va être responsable du caractère systémique de la maladie, pouvant affecter n'importe quel organe.

On classe classiquement les vascularites selon la taille des vaisseaux atteints et selon le caractère primitif ou secondaire de la vascularite. Il peut s'agir des vascularites associée aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) comme la granulomatose avec polyangéite (GPA) (anciennement nommée maladie de Wegener), la polyangéite microscopique (MPA) et parfois la granulomatose éosinophilie avec polyangéite (EGPA) (anciennement nommée maladie de Churg et Strauss) (**Van der Woude et al., 2005**).

- Parmi ces MAI non spécifiques d'organe, on trouve également les connectivites. Elles sont en général caractérisées par la présence d'auto-anticorps anti-nucléaires. On retrouve des anticorps anti-ADN natif, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Sc170, anti-centromère et anti-ribonucléoprotéine (RNP) (**Guillevin et al., 2011**).

**Tableau I :** Maladies auto-immunes et anticorps mis en jeu (Lydyard, 2002)

Maladies auto-immunes non spécifiques d'organe		Maladies auto-immunes spécifiques d'organe	
Maladies	Anticorps	Maladies	Anticorps
Lupus érythémateux disséminé	Anti-ADN natif Anti-Sm	Maladie d'Addison	Anti-corticosurrénales
Sclérodermie	Anti-Scl 70	Maladie de Basedow	Anti-récepteur de la TSH
Syndrome de Gougerot-Sjörger	Anti SSA Anti SSB	Thyroïdite de Hashimoto	Anti-peroxydase thyroïdienne (anti-TPO). Anti-thyroglobuline (anti-Tg).
Polyarthrite rhumatoïde	Anti-RNP		
Syndrome des anti-phospholipides (SAPL)	Anti-phospholipides	Myasthénie	Anti-récepteur de l'acétylcholine.
Syndrome de Raynaud	Anti-centromère	Maladie de cœliaque	Anti-gliadine
Myosite	Anti-Jo1		



### I-5 Etiologie des maladies auto-immunes :

Dans la très grande majorité des cas, les maladies auto-immunes sont des pathologies multifactorielles : c'est-à-dire qu'un ensemble de facteurs de risque génétiques et environnementaux contribuent à leur apparition. Les facteurs génétiques, à eux seuls, ne suffisent généralement pas à déclencher ces maladies. Des facteurs environnementaux comme les médicaments, les toxines, les infections jouent aussi un rôle dans le déclenchement de ces maladies (**Roitt et Rabson, 2002**).

#### I-5-1 Facteurs génétiques :

L'existence d'une prédisposition génétique est démontrée par les formes familiales de maladies auto-immunes spécifiques ou non spécifiques d'organes. Des études ont été menées sur des jumeaux dans le cadre de maladies auto-immunes. Lorsqu'un vrai jumeau présente un lupus, le deuxième jumeau développera la maladie dans 25 à 50 % des cas. Par contre, ce taux de concordance tombe autour de 2% pour les faux jumeaux. Cela illustre bien que le patrimoine génétique est important dans l'apparition de ces maladies. Cependant, cette concordance n'est que partielle, ce qui suggère le rôle d'autres facteurs, en particulier l'environnement (**Henderson et al., 2000**).

#### I-5-2 Facteurs environnementaux :

Même si la prédisposition génétique est un facteur très important, des facteurs environnementaux (facteurs qualifiés d'exogènes, car venant de l'extérieur du corps) sont souvent indispensables pour le déclenchement d'une maladie auto-immune (**Ozenet al., 2003**) :

- Les agents infectieux (en particulier les virus) : c'est le cas du rhumatisme articulaire aigu qui est secondaire à une infection à streptocoques bêta hémolytiques de groupe A. De même, il existe une forte suspicion de lien entre le déclenchement de la maladie Guillain-Barré et des infections bactériennes, notamment avec l'agent infectieux *Campylobacter jejuni*. Dans les autres cas de maladies auto-immunes, il n'existe à ce jour pas de preuve formelle d'association avec des agents infectieux.
- Les agents toxiques (comme le tabac dans la maladie de Goodpasture). Parmi les patients atteints de cette maladie, environ 40% d'entre eux souffrent d'hémorragie pulmonaire et il s'agit de fumeurs. En effet, le tabac cause une inflammation des alvéoles pulmonaires, l'auto-

antigène impliqué dans cette maladie devient accessible aux auto-anticorps ce qui aboutit à une destruction des cellules et à l'hémorragie (Meyer *et al.*, 1999).

### I-6 Mécanismes de l'auto-immunisation :

Les mécanismes à l'origine des MAI sont variés. En l'absence de toute pathologie, il existe chez l'individu sain des lymphocytes B et des lymphocytes T auto-réactifs, ainsi que des auto-anticorps (Bonnotte, 2004).

L'apparition de manifestations auto-immunes est la conséquence d'un défaut de vigilance ou de contrôle du système immunitaire entraînant une rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Il peut s'agir d'un déficit quantitatif ou qualitatif de certaines populations de lymphocytes dont le rôle est de réguler le système immunitaire (lymphocytes T régulateurs ou Treg) ou de l'émergence d'un clone lymphocytaire T ou B auto-réactif, c'est-à-dire reconnaissant un auto-antigène (Graham *et al.*, 2006).

Ce phénomène qui conduit à une rupture de tolérance peut se produire selon plusieurs mécanismes :

- Mimétisme moléculaire ou réaction croisé : Cette notion de « mimétisme moléculaire » signifie que certains antigènes microbiens peuvent partager des motifs communs avec des antigènes du soi et être à l'origine de l'activation de cellules auto-réactives (Figure 1). Ainsi, à l'occasion d'une infection par une bactérie, un virus ou un parasite qui exprime des antigènes apparentés avec les antigènes du patient, l'organisme va déclencher une réponse immunitaire qui va détruire à la fois cet agent infectieux mais aussi ses propres cellules (Figure 2) (Levin *et al.*, 2002).

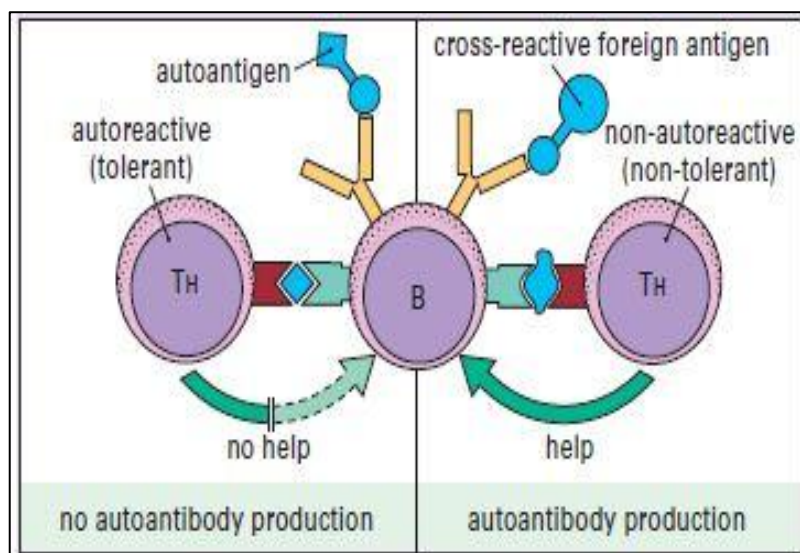
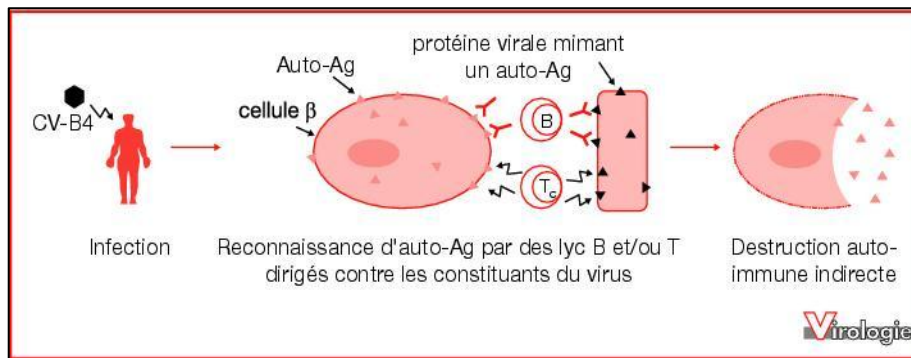


Figure 1 : Induction des auto-anticorps par des antigènes cross-réactifs (Male *et al.*, 2006).

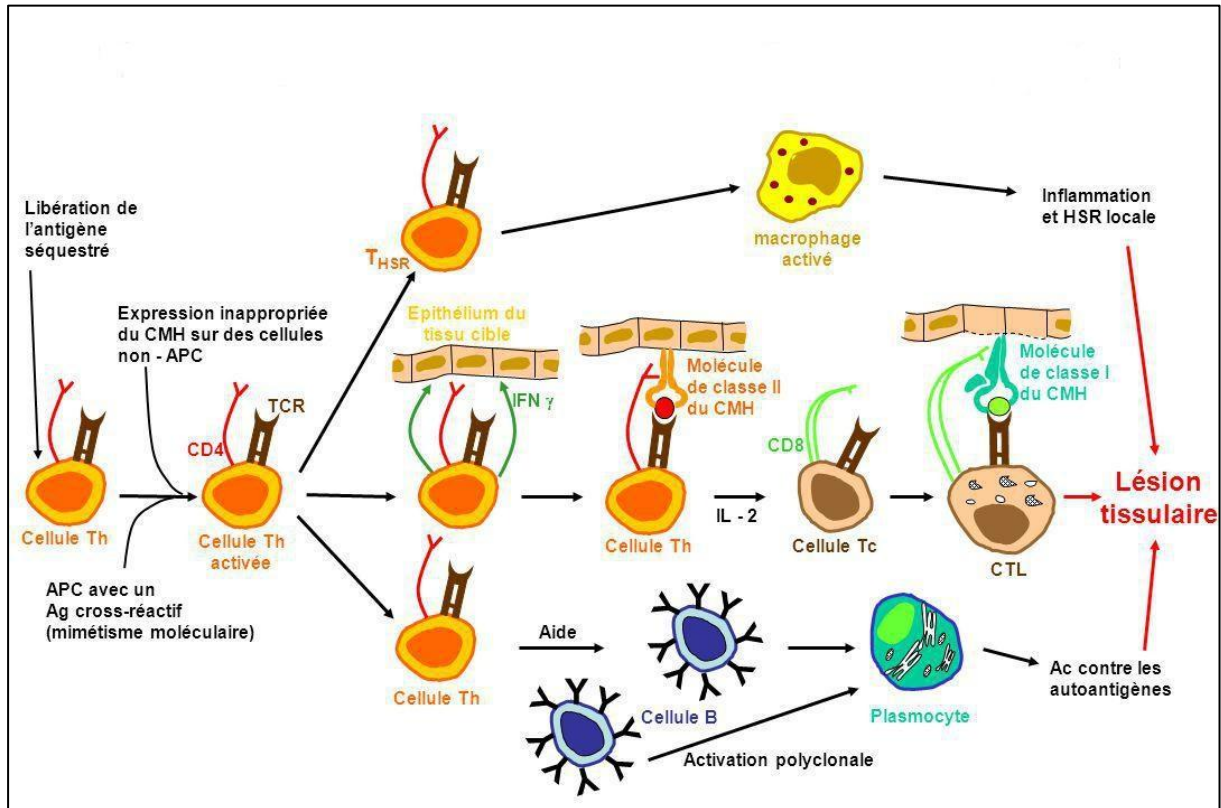


**Figure 2:** Principe du mimétisme moléculaire appliqué dans une infection par CV-B4 (Jaïdane et al., 2008).

- L'expression anormale des molécules HLA de classe II à la surface de cellules, qui, naturellement, n'en expriment pas, peut permettre à des lymphocytes T ayant échappés à la délétion et à l'anergie de reconnaître un auto-antigène. Des infections, en particulier virales, peuvent induire une telle expression. Un défaut de contrôle par des cellules T suppressives peut aussi contribuer à l'auto-immunisation, comme le montrent certains modèles animaux et comme le suggèrent les déficits en fonctions T-suppressives constatés dans un nombre de maladies auto-immunes (Bennett et al., 2003).

- Rôle des cytokines : L'IFN- $\alpha$  jouerait aussi un rôle dans d'autres pathologies auto-immunes soit en augmentant la différenciation des monocytes et les cellules dendritiques, soit en augmentant l'expression des auto-antigènes qui pourraient alors être reconnus par les lymphocytes T (Figure 3).

- Une hyperactivité des lymphocytes T et/ou B est aussi évoquée et constatée dans certaines maladies auto-immunes, en particulier systémiques. Elle peut être due à une infection des lymphocytes B par le virus d'Epstein Barr, à une activation polyclonale (Figure 3) par un super antigène d'origine infectieuse, à une réaction du greffon contre l'hôte chez un receveur de moelle osseuse, à un traitement par l'IL-2 ou encore à un défaut d'apoptose (Welch et al., 1998).



T HSR : Hypersensibilité retardée médiée par les lymphocytes T.

**Figure 3** : Mécanismes d'induction des réponses auto-immunes (Blanco et al., 2001).

### II. Auto-anticorps :

Les auto- anticorps sont des immunoglobulines produites par un individu en réponse à l'un de ces propres constituants (auto-antigènes). Ces autoantigènes sont surtout des protéines (glycoprotéines et enzymes) et des acides nucléiques. Ils sont dirigés contre différentes cibles : des protéines structurales (histone et laminine), des protéines fonctionnelles (facteur intrinsèque, récepteur de la THS), des acides nucléiques (ADN et ARN) ou des ribonucléoprotéines (Ro, La, Sm et RNP) et d'autres structures comme les phospholipides **(Arnaud et Amoura, 2008)**.

Les auto-anticorps sont les principaux marqueurs immunologiques des maladies auto-immunes. Ils sont utiles dans trois circonstances :

- Etablir un diagnostic difficile.
- Poser le diagnostic étiologique d'un syndrome.
- Suivre l'évolution d'une maladie auto-immune sous traitement.

On en distingue deux types : les auto-anticorps spécifiques d'organes et les auto-anticorps non spécifiques d'organes comme les anticorps antinucléaires présents dans les maladies systémiques **(Sibilia, 2000)**.

#### II. 1 Auto-anticorps antinucléaires :

Les auto-anticorps antinucléaires sont des anticorps non spécifiques d'organes dirigés contre des constituants du noyau des cellules. Le terme comprend aussi les anticorps dirigés contre les composants intracytoplasmiques d'origine nucléaire **(Peter et al., 2006)**.

On distingue plusieurs sous-groupes selon la spécificité :

1- Auto-anticorps anti-ADN : les auto-anticorps anti-AND peuvent reconnaître au moins deux formes d'ADN : l'ADN natif (double brin) et l'ADN dénaturé (simple brin). Seuls les anti-ADN natif (ADN<sub>n</sub>) sont fortement associés au lupus érythémateux systémique et ont une réelle valeur diagnostique **(Bach et Chatenoud, 2012)**.

2- Auto-anticorps anti-antigènes nucléaires solubles : les auto-anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (anti-ENA) sont le plus souvent dirigés contre des particules de ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP pour small nuclear RNP) associées à des ARN de faible

poids moléculaires. Ces anticorps ont de nombreuses spécificités mais il en existe quatre principales ayant un intérêt clinique :

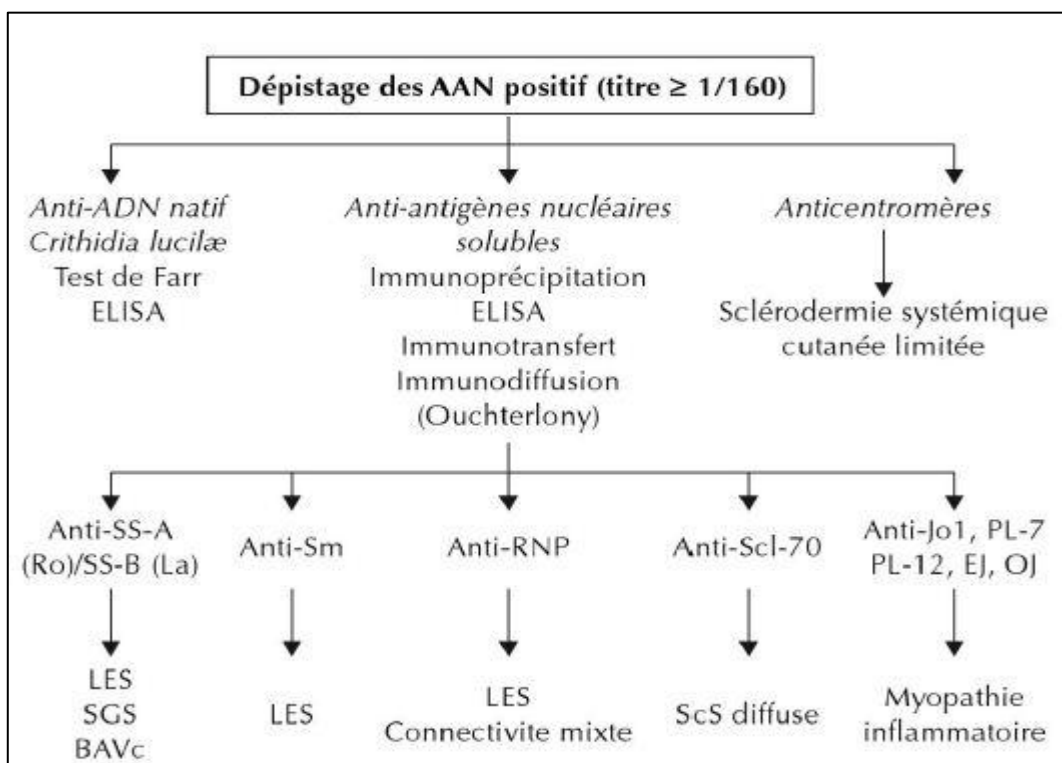
- **Auto-anticorps anti-Sm** : l'antigène Sm, baptisé des deux premières lettres du nom du premier patient, est un complexe contenant des ARNs de petite taille. Ils sont très spécifiques du LES et ont donc été inclus dans les critères sérologiques de la maladie, au même niveau que les anticorps anti-ADN.
- **Auto-anticorps anti-RNP** : comme les anticorps anti-Sm, les anticorps anti-RNP sont dirigés contre des protéines faisant partie des snRNP et plus précisément contre des protéines associées à l'ARN (Migliorini et al., 2005).
- **Auto-anticorps anti-SSA (Ro) et anti-SSB (La)** : les auto-anticorps anti-SSA reconnaissent des ribonucléoprotéines de petite taille et sont dirigés contre la forme native de la protéine (Ro). L'association de ces auto-anticorps avec certaines manifestations cliniques suggère leur rôle dans la survenue de lésions tissulaires, comme au cours du lupus néonatal, où ils sont détectés chez les nouveau-nés de mère ayant des anticorps anti-SSA dans le sérum par transfert passif de l'auto-immunité avec passage transplacentaire. Les auto-anticorps anti-SSB sont dirigés contre une phosphoprotéine qui s'associe à différents ARN (Franceschini et al., 2005).
- **Auto-anticorps anti-Scl-70** : les anticorps anti-Scl-70 ou anti-topoisomérase I qui est une enzyme capable de couper, lier l'ADN simple brin et relâcher l'ADN superenroulé dans des conditions *in vitro*) ils sont très spécifiques de la sclérodémie systémique (Reveille, 2003).
- **Auto-anticorps anti-Jo-1** : ceux sont des anticorps dirigés contre les aminoacyl-ARNt-synthétases. Le système d'anticorps anti-Jo-1 a été décrit pour la première fois en 1980 par Nishikai et Reichlin dans le sérum d'un patient présentant une polymyosite et une fibrose pulmonaire interstitielle, qui se prénommeait John, d'où le nom d'anti-Jo-1 (Zampieri et al., 2005).

3- Auto-anticorps anti-nucléole : Les anticorps antinucléole ont une apparence caractéristique à l'IFI. Les cibles antigéniques sont reconnues par divers anticorps qui incluent les anticorps anti-U3-RNP (ou anti-fibrillarine), anti-PM-Scl (vient de polymyosite et sclérodémie) et anti-RNA polymérase I-III (Cepeda, 2004).

4- Auto-anticorps anti-centromère : ils sont identifiables à l'IFI sous forme de granules bien répartis dans le noyau en interphase ou alors regroupés sur le kinétochore dans les cellules en mitose. Trois protéines des centromères (CENP) ont été identifiées comme cibles de ces anticorps (CENP-A, CENP-C, CENP-D). Les anticorps anticentromère sont très spécifiques de la sclérodémie systémique cutanée limitée (Reville, 2003).

### II-2 Dépistage des auto-anticorps antinucléaires :

La détection des autoanticorps justifie une stratégie en deux étapes : dépistage en immunofluorescence sur cellule Hep puis identification par une technique immunologique (ELISA, RIA, immunodiffusion) (Petitpierre et al., 2009) (Figure 4).



LES :Lupus érythémateux systémique. ScS :syndrome de Churg-Strauss

BAVc : bloc auriculo-ventriculaire congénital.

**Figure 4 :** Conduite à tenir devant la mise en évidence des AAN.

(Mouthon et Terrier, 2014)

### II-2-1 L'étape de dépistage :

La recherche d'autoanticorps nécessite une technique globale de dépistage sensible et spécifique. L'immunofluorescence est la technique la plus utilisée, car elle permet de détecter aisément un gros nombre d'autoanticorps, et cela avec plusieurs avantages : facilité d'exécution, sensibilité, possibilité de détecter plusieurs autoanticorps à la fois.

Les substrats les plus utilisés sont les cellules Hep-2 (cellules de carcinome laryngé humain), qui ont l'avantage de posséder des gros noyaux activés comprenant de nombreux antigènes nucléaires, mais aussi cytoplasmiques. Ces cellules sont fixées sur des lames commercialisées. Cette immunofluorescence peut également être effectuée sur d'autres substances, en particulier sur des coupes tissulaires, différents organes, notamment de rein, de foie et d'estomac (**Terrier et Mouthon, 2014**).

### II-2-2 L'étape d'identification :

La détection d'autoanticorps antinucléaires en immunofluorescence justifie une identification qui peut se faire de différentes façons (**tableau II**) :

– Dès l'étape d'immunofluorescence, car la localisation cellulaire ou tissulaire peut parfois être spécifique. À titre d'exemple, les anticorps anti-centromères (marqueurs du CREST syndrome) ont un aspect très caractéristique en immunofluorescence.

– D'autres techniques comme l'immunoprécipitation, les méthodes immuno-enzymatiques, la radio-immunologie, les techniques d'immunoempreinte (Western-Blot) permettent d'identifier la cible moléculaire de ces autoanticorps (**Sibilia, 2012**).



## Chapitre I : Rappels bibliographiques

**Tableau II** : Principaux autoanticorps/techniques de recherche/maladies associées (**Sibilia et Goetz, 2003**).

Auto-anticorps	Technique de dépistage	Technique de confirmation	Affections associées
Anti-nucléaires anti-ENA anti-Ro(SSA) anti-La(SSB) anti-Sm anti-RNP anti-Scl70 anti-Jo1 anti-PL7-PL12 anti-Mi2 anti-Pm-Scl/ anti-KU	IFID, IP IFID, IP IFID, IP IFID, IP IFID, IP IFID, IP IFID, IP IFID, IP IFID, IP IFID, IP	IP, ELISA, dot IP, ELISA, dot IP, ELISA, dot IP, ELISA, dot IP, ELISA, dot IP, ELISA, dot IP, ELISA, dot IP IP IP	LED, Gougerot-Sjogren, BAVC Gougerot-Sjogren, LED, BAVC LED LED, connectivite mixte Sclérodémie systémique Polymyosite Polymyosite Dermatopolymyosite Polymyosite-sclérodémie
Anti-ADN natif	IFID, ELISA, RIA	-	LED
Anti-centromères	IFID	ELISA	CREST syndrome

IFID : immunofluorescence indirecte ;  
 IP : immunoprécipitation ; RIA : technique radio-immunologique ;  
 LE : lupus systémique  
 BAVC : bloc auriculo-ventriculaire congénital.

Ce présent travail s'est déroulé à l'unité d'auto-immunité, au niveau du service d'immunologie médicale, laboratoire d'auto-immunité, du centre hospitalo-universitaire « ISSAD HASSANI » de Beni Messous pendant une durée de 6 mois, ayant pour but de :

1. Rechercher des auto-anticorps anti-nucléaire (AAN) par deux techniques: Immunofluorescence indirecte et ELISA, chez des patients atteints d'une maladie auto-immune non spécifique d'organe.
2. Comparer ces deux techniques selon la sensibilité de chacune.

### **II.1 Matériel biologique :**

#### **II.1.1 Echantillonnage :**

La population étudiée est constituée de 119 patients (90 femmes et 29 hommes dont l'âge varie entre 1 et 85 ans) présentant des signes évocateurs d'une maladie auto-immune systémique. (Voir **Annexe I**).

#### **II.1.2 Prélèvement :**

Le recrutement des échantillons a été effectué au centre de prélèvement sanguin du laboratoire, par ponction veineuse dans des tubes EDTA et dans des conditions stériles.

Après une centrifugation à 4000 tours/min pendant 5 min, les sérums sont séparés du culot dans des tubes secs numérotés, et conservés jusqu'à 5 jours au frais à une température entre - 20 à - 40 °C.

#### **II.1.3 Cellules Hep-2 :**

Les cellules Hep2 qui sont issues de la culture de cellules tumorales d'origine humaine (carcinome laryngé) possèdent des noyaux proéminents, rendant plus aisée la détection et l'analyse des anticorps antinucléaires et permettent grâce à la présence de nombreuses cellules en cours de division, la mise en évidence des auto-anticorps dirigés contre des structures mitotiques.

## **II.2 Matériels non biologiques :**

La réalisation de cette étude nécessite une variété de réactifs et d'appareillage ( **Annexe II**).

## **II.3 Méthodes :**

### **II.3.1 Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires par IFI :**

#### **II.3.1.1 Principe :**

Les lames sur lesquelles ont été cultivées les cellules HEp-2 sont incubées avec le sérum du patient à des dilutions croissantes. Les anticorps anti-nucléaire du sérum (ANA) se lient aux antigènes correspondants présents dans les cellules Hep-2. Les complexes antigènes-anticorps résultants sont ensuite révélés par un conjugué anti-immunoglobuline humain marqué à la fluorescéine et visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence.

#### **II.3.1.2 Mode opératoire :**

##### **II-3-1-2-1 Préparation des réactifs :**

1. Amener tous les réactifs et échantillons la température ambiante (20-26°C) et bien les mélanger avant de les utiliser.
2. **Diluer le tampon PBS :** ajouter le contenu de la bouteille de concentré PBS à 975 ml d'eau distillée et bien mélanger... Le tampon PBS est utilisé pour diluer les sérums des patients et comme tampon de lavage. Le tampon dilué peut être conservé jusqu'à 4 semaines à une température comprise entre 2 et 8°C.
3. **Diluer les sérums des patients :**
  - a) Dépistage initial : diluer les sérums des patients 1:40 avec la solution tampon PBS diluée.
  - b) Titrage : diluer en série en double à partir de la dilution de dépistage initiale pour tous les sérums en utilisant la solution tampon PBS (c'est-à-dire 1:80, 1:160,... 1:1000).

4. Ajouter une goutte (20 à 25  $\mu$ l) du contrôle positif non dilué et du Contrôle négatif respectivement sur les puits 1 et 2. Ajouter une goutte (20 à 25  $\mu$ l) de l'échantillon du patient sur les puits restants.

5. Incubation de la lame substrat : incuber la lame pendant 30 minutes dans une chambre humide (un essuie-tout humide placé à plat au fond d'un récipient de plastique ou de verre fermé permet de maintenir les conditions d'humidité appropriées).

6. Lavage de la lame substrat : après l'incubation, éliminer le sérum en rinçant délicatement avec la solution tampon PBS diluée. Orienter la lame et le flot de solution tampon PBS de façon à minimiser le débordement des échantillons entre les puits.

7. Addition du conjugué fluorescent : éliminer l'excès de la solution tampon PBS en secouant la lame. Replacer la lame dans la chambre humide et recouvrir immédiatement chaque puits d'une goutte de conjugué fluorescent. Incuber la lame pendant 30 minutes.

8. Lavage de la lame substrat : répéter l'étape 3 fois.

9. Montage de la lame substrat : les procédures pour le montage d'une lame à l'aide de lamelles

10. Appliquer le milieu de montage en une ligne continue sur le bord inférieur de la lamelle.

11. Éliminer l'excès de la solution tampon PBS et placer le bord inférieur de la lame contre le bord de la lamelle.

### II-3-1-3 Interprétation des résultats :

**Réaction négative** : Un échantillon est considéré négatif si une coloration spécifique est égale ou inférieure au témoin négatif. Les échantillons peuvent afficher différents degrés de coloration de fond en raison du faible niveau d'autoanticorps aux composants cytoplasmiques tels que les protéines contractiles (**Figure 5**).

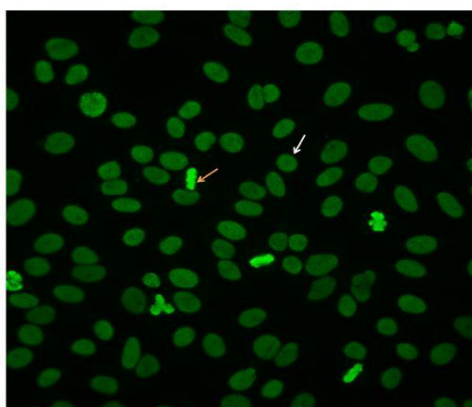


**Figure 5** : Témoin négatif (Buchner et *al.*, 2014)

**Réaction positive** : Un échantillon est considéré comme étant positif si une coloration nucléaire spécifique est notée et est supérieure au contrôle négatif.

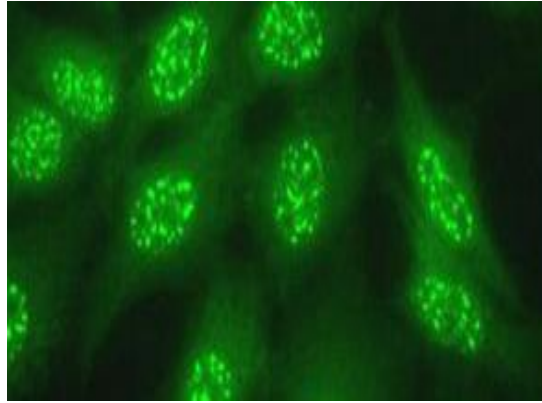
**Interprétation de l'aspect** : Différents marquages nucléaire ou cytoplasmique peuvent apparaître en fonction des types et quantités relatives d'autoanticorps présents dans l'échantillon. Lors de l'évaluation des résultats, quatre principaux aspects de fluorescence sont les plus fréquemment observées : homogène, moucheté, nucléolaire et centromère.

- **Aspect homogène** : Fluorescence homogène et uniforme de tout le noyau des cellules en interphase. Forte fluorescence des cellules mitotiques ( **Figure 6** ).



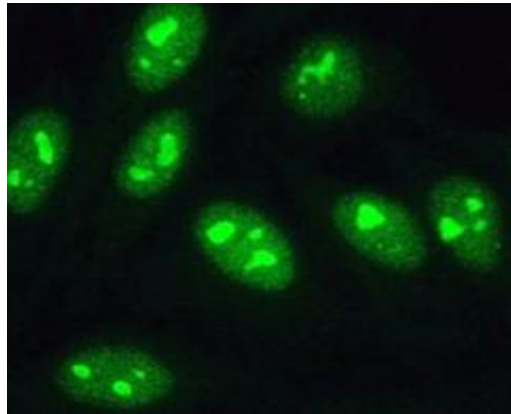
**Figure 6** : Aspect homogène (flèche orange).Cellule au repos (flèche blanche). (Buchner et *al.*, 2014)

- **Aspect moucheté** : fluorescence intense et granulaire de l'ensemble du noyau. . Il existe plusieurs tailles et formes des graines en fonction de l'antigène réagissant (Figure 7).



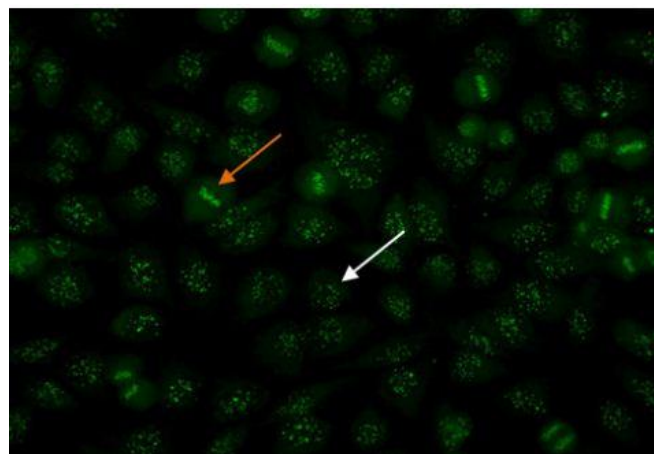
**Figure 7 :** Aspect moucheté. (Buchner *et al.*, 2014)

- **Aspect nucléolaire :** gros grains fluorescents dans le noyau, généralement moins de six par cellule, avec ou sans un marquage moucheté fin (**Figure 8**).



**Figure 8 :** Aspect nucléolaire. (Buchner *et al.*, 2014)

- **Aspect centromère :** Points discrets sur les cellules en interphase, ils s'alignent avec les chromosomes en métaphase (**figure9**).



**Figure 9 :** Aspect centromère (flèche orange).Cellule au repos (flèche blanche). (Buchner *et al.*, 2014)

### II-3-2 Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires par ELISA :

#### II-3-2-1 Principe :

Les micropuits sont recouverts d'un mélange d'antigènes purifiés SS-A-52 (Ro-52), SS-A-60 (Ro-60), SS-B (La), RNP/Sm, RNP-70, RNP-A, RNP-C, Sm-BB, Sm-D, Sm-E, Sm-F, Sm-G, Scl-70, Jo-1, dsDNA, ssDNA, polynucleosomes, mononucleosomes, , histone H1, histone H2A, histone H2B, histone 3, histone H4, Pm-Scl-100, centromère B.

La réaction est basée sur le principe de l'ELISA indirect, avec les étapes suivantes :

Des anticorps spécifiques contenus dans l'échantillon à tester se lient aux surfaces recouvertes d'antigènes dans les deux puits de réaction formant un complexe antigènes-anticorps. Après l'incubation, une première étape de nettoyage élimine les molécules non liées et les molécules liées non spécifiques. Le conjugué ajouté par la suite se lie aux complexes antigènes-anticorps qui se forment. Après l'incubation, une seconde étape de nettoyage élimine le conjugué superflu. L'ajout de solution de substrat d'enzyme entraîne l'hydrolyse et le développement des couleurs pendant l'incubation. L'addition d'un acide arrête la réaction formant une couleur jaune produit final.

L'intensité de la couleur jaune varie en fonction de la concentration des complexes antigènes-anticorps et est mesurée à 450 nm par un module optique.

#### II-3-2-2 Mode opératoire :

##### Préparation des réactifs :

**Lavage** : Le contenu de chaque bouteille de solution de lavage (20 ml) doit être dilué – avant l'utilisation – par l'ajout d'eau distillée jusqu'à un volume final de 1000 ml (1 litre).

**Diluant** : Diluer le contenu (20 ml) de chaque flacon de concentré (5x) de tampon de dilution avec de l'eau distillée, pour obtenir un volume final de 100 ml.

**Sérums des patients** : Diluer tous les sérums des patients à 1:100 avec le tampon d'échantillon. Mélangez bien. Les contrôles (contrôle A : négatif, contrôle B : limite, contrôle C : positif) et calibrateurs sont prêts à l'emploi et ne nécessitent pas de dilution.

Préparer un nombre de barrettes suffisant pour tous les contrôles et les sérums dilués.

1. Distribuer **100 µl** de calibrateurs, de contrôles et d'échantillons dilués dans les puits.

Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante (20-28°C)

Aspirer le contenu des puits et **laver 3 fois** avec **300 µl** de solution de lavage.

2. Distribuer **100 µl** de conjugué dans chaque puits.

Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante.

Aspirer le contenu des puits et **laver 3 fois** avec **300 µl** de solution de lavage.

3. Distribuer **100 µl** de TMB dans chaque puits.

Incuber pendant **15 minutes** à température ambiante.

4. Ajouter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits

Incuber **5 minutes** à température ambiante.

Lire la densité optique à 450 nm (référence 600-690 nm) et calculer les résultats.

La couleur obtenue est stable pendant au moins 30 minutes. Lire pendant ce laps de temps.

### II-3-2-3 Interprétation des résultats :

Pour obtenir des résultats qualitatifs de la densité optique (OD) d'un échantillon est comparée à la densité optique du Contrôle B:

Négatif: DO échantillon < DO contrôle B.

Positif: DO échantillon  $\geq$  DO contrôle B.

Pour les résultats détaillés de la densité optique d'un échantillon est exprimée en valeur de l'indice:

$$\text{Indice} = \text{DO échantillon} / \text{DO contrôle B.}$$

Un résultat est considéré comme :

Négatif      Indice < 0.8

Limite      Indice 0.8 - 1.0

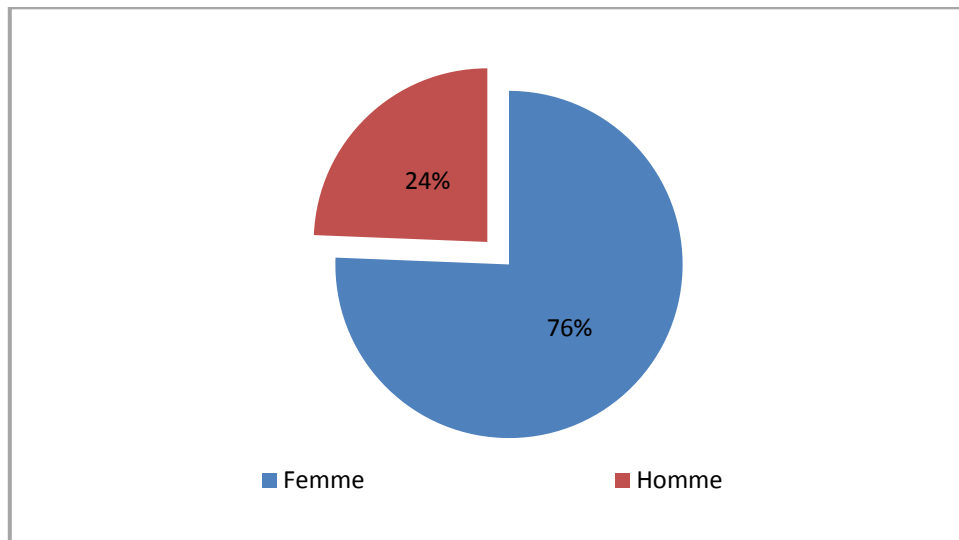
Positif      Indice > 1.0



### III. 1 Echantillonnage :

#### III.1.1 Répartition selon le sexe :

Notre population étudiée comprend 90 femmes (76%) et 29 hommes (24%) avec un sex-ratio de 3/1 (**Figure 10**).



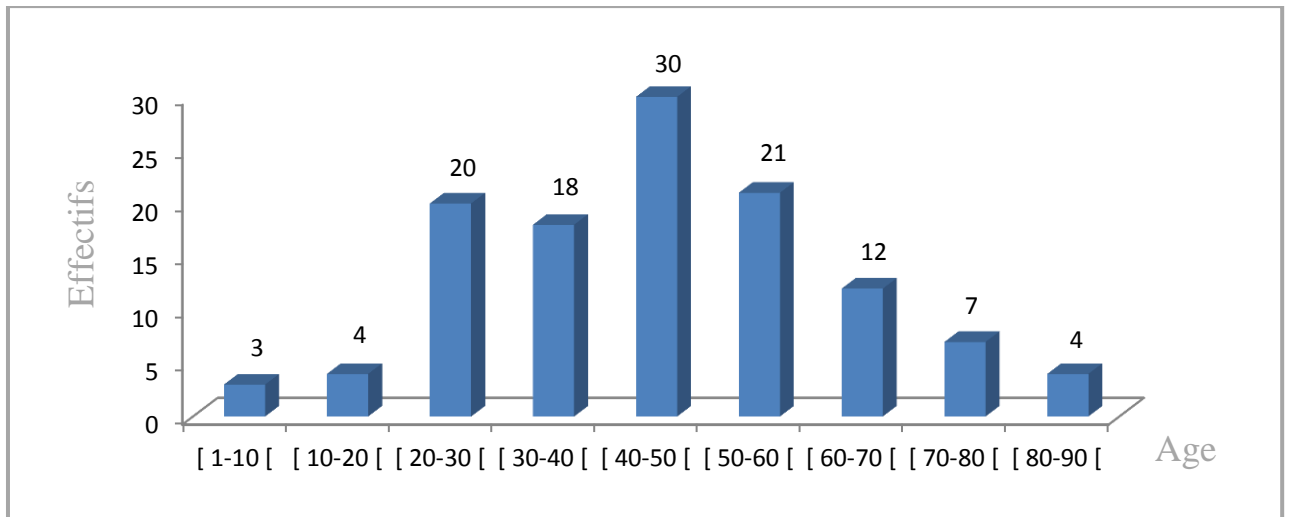
**Figure 10** : Représentation de la répartition des patients selon leur sexe.

Selon **Feki et al., (2012)** les maladies auto-immunes systémiques touchent à la fois les hommes et les femmes, mais il existe une nette prédominance féminine : 72 femmes (80%) et 18 hommes (20%).

De même, les résultats globaux de **Wijeyesinghe et Russell (2008)** ont montré une nette prédominance féminine avec un sex-ratio de 4/1.

#### III.1.2 Répartition selon l'âge :

Dans cette population étudiée, l'âge varie entre 1 et 85 ans avec une moyenne de 44,06 ( $\pm 17,83$ ) ans. La tranche d'âge la plus représentée est entre 40 et 50 ans (**Figure 11**).



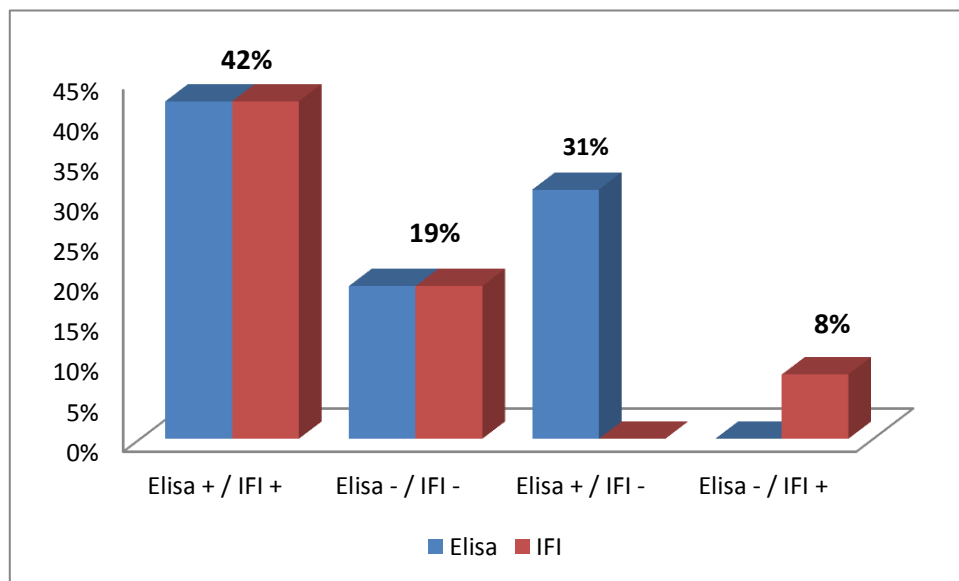
**Figure 11** : Répartition des malades selon l'âge.

Ces résultats rejoignent ceux de **Feki et al., (2012)** qui décrivent que les maladies auto-immunes systémiques peuvent survenir à tout âge, mais la moyenne d'âge la plus représentée est de 44,5 ans.

### III. 2 Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires :

#### III.2.1 Sensibilité IFI / ELISA :

Les résultats de la recherche des auto-anticorps anti-nucléaires (ANA) par IFI et ELISA sont illustrés dans la figure suivante (**Figure12**):



**Figure12** : Répartition des résultats en fonction de la positivité et la négativité des deux techniques : IFI et ELISA.

Notre étude a révélé que 73% des patients atteints d'une maladie auto-immune systémique étaient positifs en ELISA et 50% étaient positifs en IFI.

Sur les 119 patients, on a enregistré :

- 50 patients (42%) ayant des résultats positifs par IFI et ELISA.
- 23 patients (19%) ayant des résultats négatifs par IFI et ELISA.
- 37 patients (31%) ayant des résultats positifs par ELISA et négatifs par IFI.
- 9 patients (8%) ayant des résultats négatifs par ELISA et positifs par IFI.

**Caciagli et al., (2004)** ont évalué la sensibilité dans 5 kits d'ELISA pour la détection des ANA et l'ont comparée avec celle de l'IFI. Le taux de sensibilité de l'IFI était de 92% alors que celui des 5 kits d'ELISA étaient respectivement : 88%, 93%, 74%, 94%, 88%.

Contrairement à **Bossuyt (2000)** qui n'a pas confirmé la haute sensibilité de l'ELISA, **Gniwek et al., (1997)** ont recherché des auto-anticorps anti-nucléaires chez 98 patients atteints d'une connectivite : 88,8% étaient positifs par IFI et 92,9% étaient positifs par ELISA. Ceci confirme qu'il n'y avait pas de différence de sensibilité entre les deux techniques.

**Tonutti et al., (2004)** ont trouvé que dans les 240 sérums de sujets ayant une maladie auto-immune systémique, la sensibilité de la technique d'ELISA était tout à fait comparable à celle de l'IFI (92% pour ELISA Vs 93% pour l'IFI).

Notre étude a démontré qu'un nombre important de patients avec des ANA positifs en ELISA ont été retrouvés négatifs en IFI. En effet, ces patients avaient des ratios faiblement positifs [1–2], ce qui a empêché de les détecter par la technique d'IFI.

Cette discordance pourrait être expliquée par l'extrême sensibilité de la technique d'ELISA à l'origine du nombre important des faibles positifs. Étant donné que nous n'avons pas analysé les données d'identification des ANA positifs, nous ne pourrions pas confirmer si réellement ces ANA sont positifs ou considérés comme faux positifs.

### III.2.1.1 ELISA+ / IFI + :

La concordance entre les titres de l'IFI et les moyennes des ratio de l'ELISA est représentée dans le **tableau III**.

**Tableau III** : Concordance entre les résultats de l'IFI et l'ELISA (Titre Vs Ratio).

Titres (IFI)	Effectif s	Moyennes des Ratio (ELISA)
1/80	18	1,26
1/160	2	1,20
1/320	11	3,91
1/640	18	6,4
1/1000	9	6,68

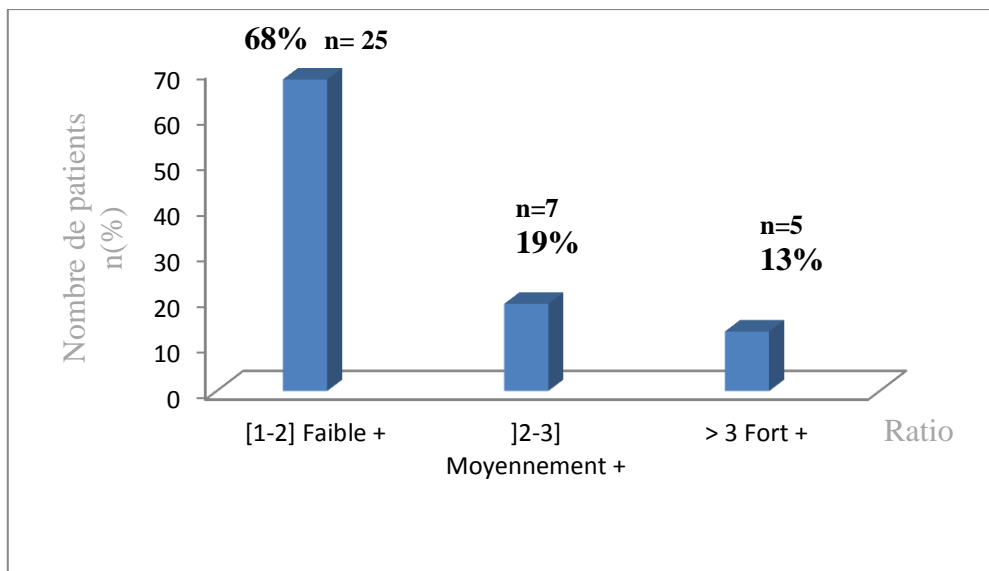
Selon les résultats présentés dans le **tableau III** on remarque que plus le titre de l'IFI est élevé plus la densité optique qui est représentée par la moyenne des ratio augmente (sauf pour le titre 1/160 avec n=2 qui représente une moyenne de 1,20 < 1,26).

Ces résultats confirment qu'il y a une bonne concordance entre le signal enzymatique de l'ELISA et le titre de l'IFI.

Nos résultats rejoignent ceux de **Tonutti et al., (2004)** qui ont montré une bonne concordance entre le titre de l'IFI et le signal enzymatique : la sensibilité de l'ELISA augmentait avec les titres élevés.

### III.2.1.2 ELISA + / IFI - :

Sur les 37 patients ayant des résultats positifs par la technique d'ELISA et négatifs par la technique d'IFI, un pourcentage très élevé de patients a été enregistré avec un ratio faiblement positif compris entre 1-2 (68% avec n=25 patients) (**Figure 13**).



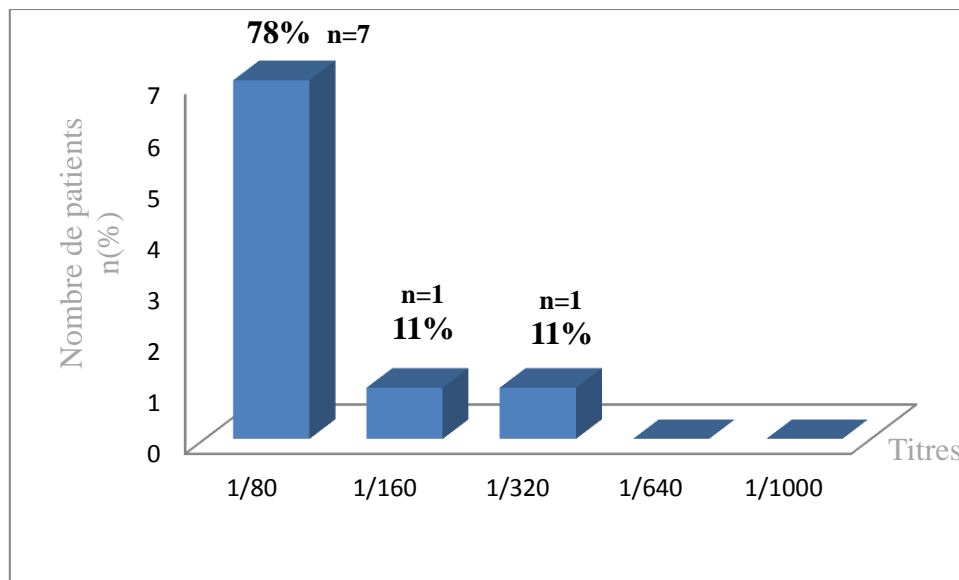
**Figure 13** : Résultats de la recherche des auto-anticorps anti-nucléaires par ELISA (IFI -).

Selon l'étude menée par **Homburger (1995)**, 20 sérums étaient négatifs par IFI mais ont marqué des taux positifs par la technique d'ELISA. Ceci confirme que dans certains cas, la détection des auto-anticorps anti-nucléaires par la technique d'ELISA montre une meilleure sensibilité que l'IFI dans le diagnostic des maladies auto-immunes systémiques. En effet, certains auto-anticorps dirigés contre des antigènes (tels que Ro/SSA et Jo-1) qui sont très solubles ou faiblement présentés sur les substrats cellulaires peuvent être facilement détectés par des tests où les antigènes sont fixés sur une phase solide.

De plus, les antigènes purifiés dans la technique d'ELISA possèdent leur conformation native et ressemblent à ceux présents à l'état vivant (c'est-à-dire dans la cellule). (**Rondeel, 2002**)

### III.2.1.3 ELISA - / IFI + :

Dans notre étude la prévalence des auto-anticorps anti- nucléaires positifs par IFI (négatifs par ELISA) avec un seuil de 1/80 est de 78% (**Figure 14**).



**Figure 14 :** Résultats de la recherche des auto-anticorps anti-nucléaires par IFI (ELISA -).

Les résultats de **Balsi et al., (1993)** ont retrouvé 3 sérums sur 60 qui étaient positifs par IFI (négatifs par ELISA) avec un seuil  $\geq 160$ .

Dans l'étude réalisée par **Dahle et al., (2004)** la prévalence des AAN positifs pour un seuil de 1/160 est de 17,4 % (829 sérums positifs sur les 4753). Ce résultat est comparable avec ceux de la littérature, qui varient de 12 à 42 %. Selon **Marin et al., (2009)**, cette variation de pourcentage peut être expliquée par celle des seuils de positivité choisis (de 1/40 jusqu'à 1/160) entre les différents laboratoires.

Il existe de nombreuses études qui ont tenté de déterminer la dilution de dépistage optimale des sérums pour les tests ANA. Le titre 1/160 est considéré comme un seuil significatif pour le diagnostic des connectivites dans la majorité des laboratoires. **Kiuttu et al., 1994**

**Ghosh et al., (2007)** ont choisi un seuil relativement élevé (1/320) comme critère d'inclusion dans leur étude. Ce choix permet d'éviter la grande prévalence des AAN positifs à de faibles titres chez les sujets sains.

Au terme de ce travail, nous avons constaté que les maladies auto-immunes systémiques touchent aussi bien les hommes que les femmes, mais il existe une nette prédominance féminine avec un sex-ratio Femme / Homme de 3/1.

En revanche la moyenne d'âge dans notre série est de 44,06 ( $\pm 17,83$ ) ans, et la catégorie la plus concernée est celle dont la tranche d'âge est comprise entre 40 et 50 ans avec un effectifs  $n=33$  patients ce qui rejoint les résultats de l'étude réalisée en Tunisie.

La recherche des auto-anticorps anti-nucléaires (ANA) dans notre population de 119 patients ayant des signes évocateurs d'une maladie auto-immune systémique par les deux techniques de dépistage : Immunofluorescence indirecte et ELISA a marqué 73% de cas positifs en ELISA et 50% positifs en IFI. Nous avons noté une bonne concordance entre le signal enzymatique et le titre de l'IFI avec les différentes dilutions : 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1000 et les moyennes des ratios comprises entre 1,26 et 6,68.

L'analyse des ANA positifs en ELISA et négatifs en IFI a révélé qu'un nombre important de patients (68% avec  $n=25$ ) avaient des ratios faiblement positifs [1–2], ce qui a empêché de les détecter par la technique d'IFI. Ceci pourrait expliquer l'extrême sensibilité de la technique. Alors que 78% ( $n=7$ ) des patients avec des ANA négatifs en ELISA étaient positifs en IFI avec un titre de 1/80.

Notre travail a montré que la technique d'ELISA serait réellement plus sensible que l'IFI dans la recherche des ANA : 31% de cas négatifs en IFI et positifs en ELISA avec des ratios faiblement positifs et 8% de cas négatifs en ELISA et positifs en IFI avec de faible titre. Afin d'éviter les résultats faux positifs, il serait intéressant de revoir les seuils de positivité (un titre de 1/160 pour la technique d'IFI et un ratio de 1,2 pour ELISA).

## Références bibliographiques

Arnaud L, Amoura Z. (2008)

Conduite à tenir devant une recherche positive d'anticorps antinucléaires.,diagnostics difficiles en medecine interne, 3eme ed. Maloine, Paris.

Bach,JF et Chatenoud,L. (2012)

Immunologie 6<sup>ème</sup> éd. Lavoisier, 467p, Paris.

Bennett L., Palucka AK., Arce E., Cantrell V., Borvak J., Banchereau J. (2003)

Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*, n°197,711–23.

Blanco P., Palucka AK., Gill M., Pascual V., Banchereau J. (2001)

Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus.*Science*, 294, 1540–3.

Bonnotte, B. (2004)

Physiopathologie des maladies auto-immunes. *revue de médecine interne*, n°25, 648–658.

Bossuyt X. (2000)

Evaluation of two automated enzyme immunoassays for detection of antinuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med*,n°38,1033–7.

Buchner, C., Bryant, C., Eslami, A., Lakos, G . (2014)

Anti-Nuclear Antibody Screening Using HEp-2 Cells. *J. Vis. Exp*, n°88,191-198 .

Cepeda, EJ et Reveille, JD. (2004)

Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: Clinical indications and relevance. *Curr Opin Rheumatol*, n°16:723-32.

Chyderiotis G., Ebel A., Oger L. (2003)

Diagnostic des maladies auto-immunes, Document Biomedical diagnostics, Paris.



Dahle,Ch., Skogh,T., Aberg,AK., Jalal,A., Olcén,P. **(2004)**  
Methods of choice for diagnostic antinuclear antibody (ANA) screening: benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. *J Autoimmun*, n°22, 241–8.

Feki,S., Frikha,F., Ben Hadj Hmida,Y., Abed,S., Ben Ayed,M., Turki,H., Hachicha ,J., Baklouti,S., Bahloul,Z., Masmoudi,H. **(2012)**  
Prévalence et valeur diagnostique des anticorps antinucléaires de spécificité antigénique indéterminée : étude rétrospective à propos d'une série de 90 patients. *La Revue de médecine interne*, n°33,475–481.

Franceschini F, Cavazzana I. **(2005)**  
Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies. *Autoimmunity*, n°38:55-63.

Ghosh P., Dwivedi S., Sita N., Vikas A., Anupam V., Amita A. **(2007)**  
Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence: optimum screening dilution for diagnosis lupus erythematosus. *Indian J Med Res*,n°126,34–8.

Gniewek RA., Sandbulte C., Fox PC. **(1997)**  
Comparison of antinuclear antibody testing methods by Roc analysis with reference to disease diagnosis. *Clin Chem*,n°43, 1987–9.

Graham RR., Kozyrev SV., Baechler EC . **(2006)**  
A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, n°38,550-5

Guillevin L., Pagnoux C., Seror R., Mahr A., Mouthon L., Le Toumelin P. **(2011)**  
The Five-Factor Score revisited: assessment of prognoses of systemic necrotizing vasculitides based on the French Vasculitis Study Group (FVSG) cohort. *Medicine (Baltimore)*, n° 90, 19-27.

Henderson RD., Bain CJ., Pender MP. **(2000)**  
The occurrence of autoimmune diseases in patients with multiple sclerosis and their families. *J Clin Neurosci*, n°7,434–7.

Homburger, H.A. (1995)

Cascade testing for autoantibodies in connective tissue disease, Mayo Clin. Proc. 70, 183-184.

Jaïdane,H.,Goffard,A., Gharbi,J., Hober,D (2008)

Vers une meilleure compréhension de la relation entre entérovirus et diabète de type1.n°3,178-200.

Jennette JC., Falk RJ., Andrassy K. (1994)

Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. Arthritis Rheum,n°37, 187-92.

Kaux,J.F., Le Goff,C., Chapelle,J.P., LutteriL. (2008)

Comment j'explore.Revue des principaux auto-anticorps. Revue Médicale de Liège,n°63, 43-49.

Kiuttu J., Hartikainen A., Makitalo R. (1994)

Occurrence of antinuclear antibodies in an unselected pregnancy population. Gynecol Obstet Invest, n°37,160-163.

Kuek A., Hazleman BL., Ostor AJ. (2007)

Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. Postgrad Med J, n° 83,251–60.

Levin MC., Lee SM., Kalume F., Morcos Y., Dohan Jr FC.,Hasty KA . (2002)

Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. Nat Med, n°8, 509–13.

Lydyard,P., Whelan,A., Fanger,M. (2002)

L'essentiel en immunologie. Ed Bert, 398p, Paris.

Male,D., Brostoff,J., Roth,D ., Roitt,I. (2006)

Immunologie 7<sup>ème</sup> éd.Elsevier, 535p, Canada.

Marin,G., Cardiel,H., Cornejo,H., Viveros,M. **(2009)**

Prevalence of antinuclear antibodies in 3 groups of healthy individuals: blood donors, hospital personnel, and relatives of patients with autoimmune diseases. *JClin Rheumatol*,n°15,325–9.

Meyer O., Rouquette AM., Youinou P. **(1999)**

Autoanticorps marqueurs des maladies auto-immunes. BMD Editions. 389. Paris.

Migliorini P, Baldini C, Rocchi V. **(2005)**

Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity* , n°38,47-54.

Nagamine K., Peterson P., Scott HS. **(1997)**

Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet*, n° 17,393-8.

Ozen S., Bakkaloglu A., Yilmaz E., Duzova A., Balci B., Topaloglu R . **(2003)**

Mutations in the gene for familial Mediterranean fever: do they predispose to inflammation. *J Rheumatol*, n°30,214–8.

Peter JB, Shoenfed Y. **(1996)**

Autoantibodies. Ed Elsevier, p 1-873, Amsterdam.

Petitpierre,S., Aubert,V., Leimgruber,A., Spertini,F., Bart,PA. **(2009)**

Utilité de la recherche des autoanticorps dans la pratique quotidienne. *Rev Med Suisse*, n°5,823-31

Reveille, JD et Solomon, DH. **(2003)**

Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests : Anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*, n°49:399-412.

Rondeel, J.M.M . **(2002)**

Immunofluorescence versus ELISA for the detection of antinuclear antigens. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, n°2, 226-232.

Roitt,I et Rabson,A . **(2002)**

Immunologie médicale. Maloine, 367p, Paris.

Santiago-Raber ML., Baccala R., Haraldsson KM, Choubey D, Stewart TA, Kono DH. **(2003)**

Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med*, n°197,777–88.

Sibilia J. (2000)

Les autoanticorps, marqueurs diagnostiques et pronostiques de la polyarthrite rhumatoïde. Presse Med ,n° 29 ,1723-30.

Sibilia,J. (2012)

Auto-anticorps : intérêt diagnostique et pronostique en réanimation médicale. Réanimation , n°11, 349-58

Sibilia,J et Goetz, J. (2003)

Les autoanticorps : comment les rechercher, et quelle est leur valeur diagnostique ? La Lettre du Rhumatologue - n° 291,142-9.

Terrier,B et Mouthon,L. (2014)

Le livre de l'interne :médecine interne. *Brottier*, p 1039, Paris.

Tonutti, E., Bassetti,D., Piazza,A., Visentini,D., Poletto,M., Bassetto,F.,Caciagli,P., Villalta,D., Tozzoli,R., Bizzaro,N. (2004)

Diagnostic accuracy of Elisa methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity*, n°37 (2), 171–176.

Van der Woude FJ., Rasmussen N., Lobatto S. (2005)

Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*, n°23, 425-9.

Von Andrian,UH., Mackay,CR (2000)

T-cell function and migration. Twosides of the same coin. *N Engl J Med*, n°343, 1020–34.

Welch TR., Brickman C., Bishof N., Maringhini S., Rutkowski M., Frenzke M. (1998)

The phenotype of SLE associated with complete deficiency of complement isotype C4A. *J Clin Immunol*, n°18:48–51.

Wijeyesinghe,U et Russell,AS. **(2008)**

Outcome of high titer antinuclear antibody positivity in individuals without connective tissue disease: a 10 year follow-up. Clin Rheumatol, n°27,1399–402.

Youinou,P., Renaudineau,Y., Hillion,S., Saraux,A. **(2014)**

Autoanticorps dans les maladies systémiques, International Journal of Inflammation, n°3, 551-58

Zampieri , S., Ghirardello, A., Laccarino, L. **(2005)**

Anti- Jo-1 antibodies.Autoimmunity, n°38:73-8.

## Annexe I :

**Tableau IV :** Représentation de la population étudiée avec les résultats de la recherche des ANA par la technique d'IFI et Elisa.

Sexe	Age	ELISA	Ratio	IFI	Titre	Aspect
F	51	Pos	1.6	Pos	1/80	H
F	50	Neg	0.4	Pos	1/80	H
F	27	Pos	4.0	Neg		
H	47	Pos	4.0	Neg		
F	52	Pos	8.0	Pos	1/640	H
F	43	Neg	0.8	Pos	1/160	N
F	22	Pos	4.2	Pos	1/1000	M
F	50	Pos	7.5	Pos	1/1000	M
F	85	Pos	1.3	Neg		
F	55	Pos	6.5	Pos	1/640	C
F	48	Pos	7.0	Pos	1/1000	H
F	42	Pos	2.1	Pos	1/80	N
F	76	Pos	1.4	Pos	1/640	H+centro
H	35	Pos	4.2	Pos	1/320	H
F	28	Pos	7.0	Pos	1/1000	M
H	9	Pos	1.2	Neg		
F	29	Pos	4.8	Pos	1/640	N+H
F	55	Neg	0.9	Neg		
F	27	Pos	8.4	Pos	1/640	M
F	47	Pos	2.4	Neg		
F	46	Pos	8.2	Pos	1/640	M+ Fc
H	27	Pos	1.5	Neg		
H	49	Pos	1.4	Neg		
F	43	Pos	2.5	Pos	1/640	H
H	40	Pos	8.4	Pos	1/640	H
H	1	Pos	2.3	Neg		
F	47	Pos	1.9	Neg		
F	22	Pos	4	Pos	1/1000	N+H
F	45	Pos	1.1	Neg		
H	22	Pos	1.2	Neg		
H	3	Pos	3.5	Neg		
H	39	Neg	0.9	Neg		
H	30	Pos	1.3	Neg		
F	70	Pos	2.3	Neg		
F	62	Pos	1.1	Neg		
F	41	Pos	4.4	Pos	1/320	M
F	68	Neg	0.9	Neg		
H	20	Pos	1.1	Neg		
F	38	Pos	1.1	Neg		
H	32	Pos	1.0	Pos	1/320	H

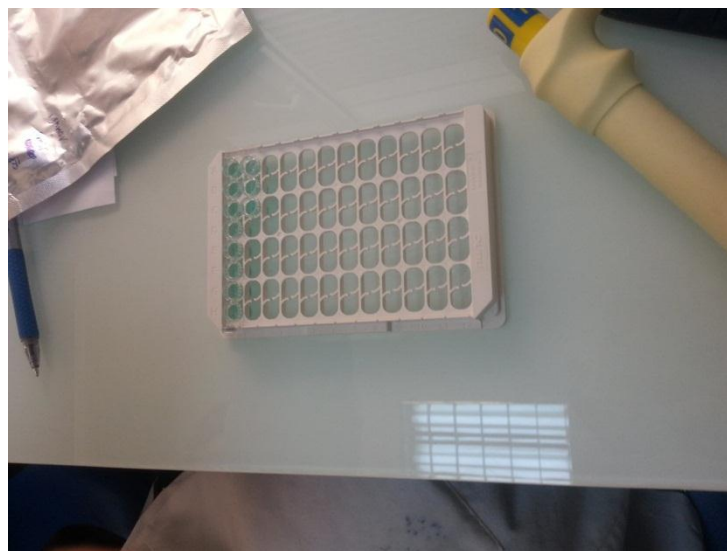
F	43	Pos	7.4	Pos	1/1000	N+H
F	57	Pos	4.5	Pos	1/640	H+N
F	63	Pos	7.4	Pos	1/320	N
F	75	Pos	2.0	Neg		
F	28	Pos	2.6	Pos	1/320	H+M+Ribo
F	44	Pos	6.4	Neg		
H	14	Pos	1.1	Neg		
H	30	Pos	6.0	Pos	1/640	M
F	25	Pos	9.2	Pos	1/640	H+M
H	33	Pos	2.7	Neg		
H	49	Pos	5.1	Pos	1/320	H
F	40	Pos	7.7	Pos	1/1000	H
F	27	Pos	1.3	Pos	1/320	H
F	51	Pos	1.3	Neg		
F	43	Neg	0.9	Neg		
F	53	Pos	1.7	Neg		
H	61	Pos	1.3	Pos	1/80	
F	55	Pos	11	Pos	1/640	C
F	80	Neg	0.9	Pos	1/80	N+Fc
F	66	Pos	1.9	Neg		
F	55	Pos	1.0	Pos	1/80	H
F	43	Neg	0.9	Neg		
F	50	Pos	1.3	Pos	1/80	H
F	21	Neg	0.8	Neg		
H	36	Neg	0.8	Neg		
F	72	Pos	1.1	Neg		
F	42	Pos	3.3	Pos	1/80	H
F	40	Neg	0.8	Pos	1/80	H
F	48	Pos	1.6	Neg		
F	45	Neg	0.8	Pos	1/80	H
F	44	Pos	8.6	Pos	1/320	M
F	80	Pos	1.0	Pos	1/80	N
F	24	Pos	1.0	Neg		
F	58	Pos	2.6	Neg		
F	41	Pos	10.1	Pos	1/1000	H+centro
F	57	Pos	2.8	Pos	1/320	H
F	57	Pos	8.7	Pos	1/640	H
F	42	Neg	0.8	Pos	1/320	N+H
F	26	Pos	11.3	Pos	1/640	H+M
H	15	Pos	2.0	Neg		
F	32	Pos	1.6	Pos	1/160	H
F	35	Neg	0.8	Neg		
F	55	Neg	0.9	Neg		
F	80	Neg	0.9	Pos	1/80	
F	64	Pos	1.0	Neg		
F	21	Neg	0.8	Neg		
F	78	Neg	0.5	Neg		
F	59	Neg	0.7	Neg		

F	31	Neg	0.7	Neg		
H	30	Neg	0.4	Neg		
H	39	Neg	0.4	Neg		
F	60	Neg	0.6	Neg		
H	39	Neg	0.7	Neg		
F	46	Neg	0.7	Neg		
H	68	Neg	0.4	Neg		
F	50	Neg	0.5	Neg		
H	26	Neg	0.6	Neg		
F	29	Neg	0.6	Pos	1/80	
F	63	Neg	0.7	Neg		
H	21	Neg	0.7	Neg		
F	35	Neg	0.6	Pos	1/80	
F	51	Pos	3.6	Neg		
F	45	Pos	1.1	Pos	1/80	M
H	10	Pos	1.1	Neg		
H	72	Pos	1.0	Neg		
F	54	Pos	5.3	Pos	1/1000	H
F	32	Pos	1.3	Neg		
H	11	Pos	1.8	Pos	1/640	leger Fc
F	55	Pos	4.6	Pos	1/640	C
F	33	Pos	1.1	Pos	1/80	M
F	63	Pos	2.9	Neg		
F	31	Pos	4.9	Pos	1/320	M
F	45	Pos	2.7	Neg		
F	62	Pos	1.8	Pos	Rods and rings+N	
F	68	Pos	1.1	Pos	1/80	H
F	45	Pos	1.0	Neg		
F	77	Pos	5.0	Pos	1/640	M
F	27	Pos	2.9	Pos	1/80	M
F	45	Pos	4.9	Pos	1/640	M



## Annexe II : Coffret ELISA utilisé

ORG 600	▽ 96	Suffisant pour 96 déterminations
MICROPLATE	1	Microplaque sécable composée de 12 barrettes de 8 puits. Prêt à l'emploi. Code de produit sur le barrette: <b>ANA</b>
CONTROL A	1x 1.5 ml	Control A (négatif), containing ANA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%). Ready to use.
CONTROL B	1x 1.5 ml	Control B (limite), containing ANA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%). Ready to use.
CONTROL C	1x 1.5 ml	Control C (positive), containing ANA antibodies in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, detergent, NaN3 0.09%). Ready to use.
DILUENT	20 ml	Diluant d'échantillon P; jaune; PBS, BSA, détergent ; 0,09 % d'acide de sodium comme conservateur, concentré (5 x).
CONJUGATE	15 ml	Conjugat d'enzyme; rouge clair; contient des anticorps anti-humains IgG avec marquage à la peroxydase. PBS, BSA, détergent ; 0,05 % de PROCLIN comme conservateur.
TMB	15 ml	Solution de substrat TMB, contient 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine. Prêt à l'emploi.
STOP	15 ml	Solution d'arrêt; contient acide. Prêt à l'emploi.
WASH	20 ml	Tampon de lavage; contient tampon Tris, détergent, 0,09 % comme conservateur, concentré (50 x).



Microplaque d'Elisa

## Coffret IFI utilisé :

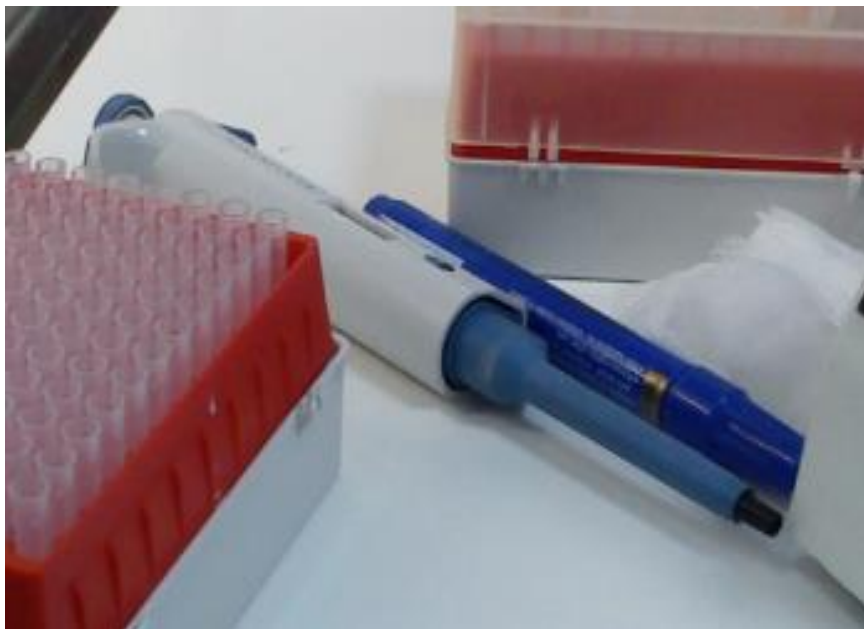
1. Lames HEp-2 ; 12 puits/lame ou 6 puits/lame
2. Lames HEp-2 (cellule épithéliale humaine) ; 12 puits/lame ou 6 puits/lame, avec dessiccateur
3. Conjugué anti-IgG-FITC humain (chèvre), fluorescéine marquée dans du tampon contenant du bleu Evans et 0,09 % d'azide de sodium, 15 ml
4. Contrôl positif ANA titrable, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué contenant des auto-anticorps anti-HEp-2, 0,5 ml
5. Contrôl Négatif, 1 flacon de solution tampon contenant 0,09 % d'azide de sodium et du sérum humain prédilué ne contenant aucun auto-anticorps anti-HEp-2, 0,5 ml
6. Concentré de PBS II (40x), suffisant pour 2 000 ml
7. Milieu de montage, 0,09 % d'azide de sodium, 7 ml
8. Lamelles couvre-objet.



Lame de cellules Hep-2



Vortex de type LABINCO



Pipette réglable