

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA
USDB/BLIDA



Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Option : Biosignalisations Cellulaires et Moléculaires / Immunologie

Thème :

Profil immunologique : Identification de quelques auto-anticorps au cours du lupus érythémateux systémique

Présenté par :

Sabrina AITCHERIF

Soutenu le 23/09/2013 devant le jury composé de:

présidente :	ZERKAOULA	MAA	USDB
Promoteur :	CHAIB. S	Professeur	HCA
Co-promoteur :	BENYAHIA. N	MAA	USDB
Examinatrice :	AISSANLR	MAA	USDB
Examineur :	GUEDIOURA. A	MAA	USDB

Promotion 2012/2013

C'est avec mon enthousiasme le plus vif et le plus sincère que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui m'ont soutenu et ont contribué à mener à bien mon projet de fin d'études. Qu'ils veuillent bien trouver à travers ce manuscrit, l'expression de ma plus profonde et respectueuse reconnaissance.

*Je tiens à remercier ma promotrice **Madame CHAIB.S professeur** et chef de service d'immunologie à l'Hôpital Central de l'Armée (HCA), de m'avoir accueilli à bras ouverts au sein de son service. Qui m'a permis de bénéficier de son encadrement tout au long de la réalisation de ce mémoire, Sa disponibilité, sa générosité, sa bonne humeur et surtout ses qualités humaines et professionnelles ont suscités en moi une grande admiration et un profond respect.*

*Je voudrais également exprimer mes sincères remerciements à mon Co-promoteur, **Mr BNYAHIA Noureddine**, Maitre-assistant à l'USDB, sans qui ce travail n'aurait jamais pu magnifiquement aboutir, pour sa disponibilité, son énergie incroyable, son enthousiasme, sa gentillesse, sa patience, ses précieux conseils, ses bonnes explications m'ont éclairé le chemin de la recherche et m'ont servi à l'accomplissement de ce travail. Ce fût un réel plaisir de travailler sous sa guidance et d'apprendre à son contact. Il est vraiment impossible pour moi de lui exprimer toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.*

J'adresse aussi ma gratitude aux membres de jury qui me font l'honneur d'évaluer ce modeste travail

*En l'occurrence Mme **ZERKAOUIA**, de m'avoir témoigné de sa confiance en acceptant de présider la commission d'examen.*

*Mes remerciements vont également à **Mme AISSANI.R** et **MR GUEDIOURA** d'accepter d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

Je remercie le personnel du service d'immunologie à l'HCA, qui m'ont impressionné par leur générosité, le plaisir visible qu'ils avaient à partager leurs connaissances et leur ouverture d'esprit.

Ma profonde gratitude et ma plus grande estime pour mes chers parents, ma sœur et mes deux frères, pour leur soutien quotidien et leur compréhension.

Enfin, Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues, avec qui j'ai partagé le plaisir d'apprendre. Merci pour le sourire, l'aide et la gentillesse, ma chère Lamia, Meriem, Lyes, Amine, Adel et tous les autres...

<<La détermination est le facteur le plus important de la réussite>>

Lord Chesterfield

Résumé

Le lupus érythémateux systémique LES est considéré comme l'archétype de la maladie auto-immune non spécifique d'organe avec un tableau clinique très polymorphe.

Nous avons analysé les caractéristiques cliniques et le profil des auto-anticorps de 20 patients algériens récemment atteints d'un lupus érythémateux systémique (LES). Les anticorps antinucléaires (AAN) ont été recherchés par technique d'immunofluorescence indirecte, les anti-ADNn (natif) par la technique d'immunofluorescence indirecte sur *crithidia luciliae*; les anticorps anti-nucléosome, anti-C1q par la technique Eliza et anti-antigènes nucléaires extractibles (ou anti-ENA : anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA, anti-SSB) par technique luminex. L'âge moyen de nos malades était de 32.5 ans et le sex-ratio F/M de 6. Les atteintes hématologiques (15 %), rhumatologiques (25 %) et cutanées (60%) ont été les manifestations cliniques initiales les plus fréquentes. 33% des malades avaient des néphropathies glomérulaires. Les AAN étaient positifs dans 100 % des cas, les antinucléosome, les anti-ADNn, les anti-C1q, les anti-Sm, les anti-RNP, les anti-SSA et les anti-SSB dans respectivement 27, 55, 37, 26, 21, 43 et 10 % des cas.

La néphropathie lupique et l'activité de la maladie sont corrélées à la présence des anticorps anti-ADNn et antinucléosomes. Tout en confirmant le polymorphisme clinique du LES, notre étude met en évidence la fréquence élevée des antinucléosome au moment du diagnostic et la prédominance des anti-SSA pour ce qui est des anti-ENA.

Mots clés : **Anti-ADN; Antinucléosome; Anti-SSA; Anti-Sm; Lupus ; luminex**

Abstract

Systemic lupus erythematosus SLE is a systemic autoimmune disease with multiorgan involvement of a complex pathoaetiology and a great clinical polymorphism.

We have analysed the clinical features and autoantibody profile of 20 algérian patients with newly diagnosed systemic lupus erythematosus (SLE). Antinuclear antibodies (ANA) and anti-dsDNA were detected by an immunofluorescence method. Antinucleosome, anti-C1q antibodies by ELISA, and anti-extractible nuclear antigens (or anti-ENA : anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA and anti-SSB) by luminex. The mean age of the patients was 32.5years and the sex-ratio F/M was 6. The most common initial features were haematological (15%), rheumatological (25%) and cutaneous (60%) disorders. 33% of the patients had glomerular nephropathy. ANA were detected in 100%, antinucleosome in 27%, anti-dsDNA in 55%, anti-C1q in 37%, anti-Sm in 26%, anti-RNP in 21%, anti-SSA in 43% and anti-SSB in 10% of patients.

The significant clinical associations were those of nephropathy and disease activity with anti-dsDNA and antinucleosome antibodies. Our results confirm the clinical polymorphism of SLE, the high frequency of antinucleosome antibodies at time of diagnosis and the predominance of anti-SSA among anti-ENA antibodies.

Keywords: Anti-dsDNA; Antinucleosome; Anti-SSA; Anti-Sm; Lupus, luminex

ملخص

يعتبر داء الذئبة الحمامية المجموعية (أو الجهازية) من أمراض المناعة الذاتية التي تصيب اعضاء مختلفة من الجسم.

لقد تم تحليل الخصائص السريرية و مظهر الأجسام المضادة الذاتية لعشرين مريض جزائري المصابين حديثا بهذا المرض. تم الكشف عن الأجسام المضادة للنواة/الأجسام المضادة ضد نووية بتقنية الومضان/ التآلق المناعي المباشر. أما مضادات الحمض النووي الأصلي فتم الكشف عنها باستخدام تقنية الومضان/ التآلق المناعي الغير مباشر على الخشف الشعورية (*Crithidia luciliae*). كما انه تم الكشف عن الأجسام المضادة للنيوكليوسومات بتقنية اليزا (ELISA)، و عن المستضدات النووية القابلة للاستخراج بتقنية لوميناكس (LUMINEX).

متوسط عمر المرضى 32.5 سنة وينتشر المرض بين النساء اكثر منه بين الرجال بـ 6 اضعاف. تعد اضطرابات الدم (15%)، الاضطرابات الروماتزمية (25%) والجلدية (60%) من المظاهر السريرية الأولية الأكثر شيوعا لدى المصابين بالذئبة الحمامية المجموعية. كما يظهر التهاب الكلية الكبيبي عند 33% منهم.

كانت الأجسام المضادة للنواة/الأجسام المضادة ضد نووية إيجابية في 100% من الحالات، أما مضادات الحمض النووي الأصلي، anti-C1q, les anti-Sm, les anti-RNP, anti-SSA et les anti-SSB فكانت على التوالي بنسبة 27 و 55 و 37، 26، 21، 43 و 10% من الحالات.

ترتبط التهاب الكلية في الذئبة الحمامية ونشاط المرض مع وجود الأجسام المضادة للحمض النووي الأصلي و الأجسام المضادة للنيوكليوسومات.

أشارت دراستنا الى ارتفاع نسبة الأجسام المضادة للنيوكليوسومات خلال مرحلة التشخيص و كذا الانتشار الواسع ل anti SSA على حساب anti ENA فيما أكدت تعدد الأشكال السريرية للذئبة الحمامية المجموعية.

الكلمات المفتاحية : مضادات الحمض النووي الأصلي ، الأجسام المضادة للنيوكليوسومات، Anti-SSA;Anti-Sm، الذئبة الحمامية المجموعية.

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : La physiopathologie du LES.	6
Figure 2 : Schéma général sur la physiologie du lupus érythémateux systémique.	8
Figure 3 : Représentation schématique de l'atteinte systémique polymorphe au cours du lupus	9
Figure 4 Les 4 aspects de fluorescence par IFI sur les cellules Hep2	10
Figure 5 : méthodologie suivie en fonction des résultats FAN.	19
Figure 6 : révélation des auto-anticorps anti-ADNn fixés au kinétoplaste.	20
Figure 7 : Algorithme utilisé au laboratoire pour la recherche des AAN.	20
Figure 8 : microplaque multi canons.	22
Figure 9 : Schéma des microplaques pour le dosage des Ac anti C1q par ELISA	23
Figure 10 : Schéma de la microplaque pour le dosage des anti-nucléosomes par ELISA.	24
Figure 11 : Schéma général de la démarche expérimentale.	26
Figure 12 : répartition des 68 patients selon l'âge.	27
Figure 13 : répartition des patients lupiques selon le sexe.	28
Figure 14 : répartition des cas selon les tranches d'âge.	28
Figure 15 : représentation graphique des résultats d'IFI sur cellules Hep-2 pour les patients atteints de LES et la population témoin.	30
Figure 16 : représentation graphique des différents aspects retrouvés chez les patients atteints de lupus systémique par IFI sur cellules Hep-2.	30
Figure 17 : les 4 aspects IFI sur cellules Hep-2.	31
Figure 18 : représentation graphique du dosage des auto-Ac anti-ADNn sur <i>Crithidia luciliae</i> chez les patients atteints de lupus.	32
Figure 19 : représentation graphique du dosage des Ac anti-ADN natif par IFI sur <i>Crithidia luciliae</i> chez les patients atteints de lupus.	32
Figure 20 : résultat d'IFI sur crithidia luciliae (la révélation des auto-anticorps anti-ADNn fixés au kinétoplaste).	33
Figure 21 : représentation graphique du dosage des ENA par Luminex chez les patients atteints de lupus.	34
Figure 22 : représentation graphique du dosage des ENA par Luminex chez les témoins atteints de maladies auto-immunes.	34
Figure 23 : représentation graphique du dosage des fractions C3 et C4 du complément par néphélométrie laser chez les témoins atteints de maladies auto-immunes	35
Figure 24 : représentation graphique du dosage des fractions C3 et C4 du complément chez les patients lupiques.	35
Figure 25 : représentation graphique du dosage des auto-anticorps anti nucléosomes par Elisa chez les patients lupiques, les témoins négatifs et les témoins positifs.	36
Figure 26 : représentation graphique des résultats du dosage des anti-corps anti-C1q par Elisa chez les patients lupiques, les témoins positifs et négatifs	38
Figure 27 : représentation graphique de la complication rénale dans le LES.	39
Figure 28 : représentation graphique de la relation entre les auto-anticorps anti-ADNn et anti-nucléosomes chez les patients lupiques	40
Figure 29 : schéma récapitulatif des facteurs et marqueurs biologiques impliqués dans la physiopathologie de la néphropathie lupique.	41

Liste des tableaux	Page
Tableau 1 : Le profil de sécrétion des cytokines dans le LES	7
Tableau 2 : Les principaux anticorps du lupus	11
Tableau 3: Différents aspects de fluorescence en fonction des cibles antigéniques reconnues par les auto-anticorps (aspects sur cellules hep-2).	12
Tableau 4: Interprétation des résultats de l'ELISA	24
Tableau 5 : valeurs normales des composantes C3 et C4	25

Liste des abréviations

AAN: Anticorps anti-nucléaires
AC : Anti-corps
ACR : <i>American College of Rheumatology</i>
AG: Antigène
ALD: Affection de Longue Durée
AMM : autorisation de la mise sur le marché
BAFF: B-cell activation factor belonging to the tumor necrosis factor family
BCR: B cell receptor
B Lys: B Lymphocyte stimulator
CIC: Complexes immuns circulants
CL: <i>Chritidia luciliae</i>
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA: Cellules présentatrice d'antigène
CRP: <i>C Reactive Protein</i> (Protéine C réactive)
DO : densité optique
EBV: Virus Epstein-Barr
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ENA: Extractable Nuclear Antigen
EU: Unité enzymatique
FAN: Facteurs anti-nucléaires
Hep2: Humain épithélioma cells type 2
HLA: humain leucocyte antigen
IFI: immunofluorescence indirect
IFNγ interférant gamma
Ig: immunoglobuline
IL: interleukine
LB: Lymphocytes B
LED: Lupus érythémateux disséminé
LES: Lupus érythémateux systémique
LT: Lymphocytes T
NK: Natural killer
NL: Néphropathie lupique
PBS: Tampon phosphate salin
SSA: sicca syndrome A
SSB: sicca syndrome B
Sm: smith
TCR: T cell receptor
TNFα: Tumor necrosis factor alpha
RNP: ribonucléoprotéines
UR: unité relative
UV: ultra violet
VS: Vitesse de sédimentation

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

CHAPITRE I: Rappels bibliographiques

I.1. Les maladies auto-immunes	2
I.1.1. Définition.....	2
I.1.2. Classification	2
I.1.3. Mécanisme physiopathologique de l'auto-immunité.....	2
I.2. Le lupus érythémateux systémique	3
I.2.1 Définition	3
I.2.2 Classification	3
I.2.3 Epidémiologie.....	4
I.2.4 Etiologie	4
I.2.5 Physiopathologie.....	5
I.2.6 Le rôle des cytokines dans la physiopathologie du lupus.....	6
I.2.7 Critères de diagnostic	9
I.2.7.1. Diagnostic clinique	9
I.2.7.1.1. Les manifestations générales du LES	9
I.2.7.2. Diagnostic biologique	10
A. Le syndrome inflammatoire	10
B. Le syndrome néphrotique	10
C. Les auto-anticorps	11
D. Le complément sérique	13
I.2.8 Thérapie	14

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel	16
II.1.1. Matériel biologique.....	16
II.1.2. Matériel non biologique.....	17

II . 2 Méthodes	17
II .2.1. Recherche des anticorps anti nucléaires et anti DNA natif par immunofluorescence indirecte (IFI).....	17
II.2.1.1. Recherche des anticorps antinucléaire par IFI sur cellules Hep-2.....	18
II .2.1.2. Recherche des anticorps anti-ADN natif par <i>Crithidia luciliae</i>	19
II .2.2. Dosage des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles par technique luminex	21
II .2.3. Dosage des anticorps anti- C1q par technique Elisa	23
II .2.4. Dosage des anticorps anti-nucléosomes par Elisa	24
II .2.5. Dosage des anticorps anti C3 et C4 par néphlémétrie laser.....	25

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III .1 Etude rétrospective	27
III .1.1. Répartition selon l'âge.....	27
III .1.2. Répartition selon le sexe	27
III .2 Etude prospective	28
III .3 Résultats du dosage des marqueurs biologiques du LES	29
III.3.1.Résultats de la recherche des anticorps antinucléaire par IFI sur cellules Hep-2.....	29
III .3.2.Résultats de la recherche des anticorps anti-ADN natif par IFI sur <i>Crithidia luciliae</i>	31
III .3.3.Résultats du dosage des anticorps anti-ENA par luminex/ELISA	33
III .3.4.Résultats du dosage des fractions C3 et C4 par néphélémétrie laser.....	35
III .3.5.Résultats du dosage des anticorps anti-nucléosome par ELISA.....	37
III .3.6.Résultats du dosage des anticorps anti-C1q par ELISA.....	38
III .4. Corrélation entre les anticorps anti-ADNn et anti-nucléosomes.....	39
III .5. Formes associées au LES.....	40
Conclusion	41
Références bibliographiques.....	43
Annexe	

INTRODUCTION

Chez certains individus, il peut arriver que le système immunitaire cesse de tolérer certaines cellules de l'organisme et qu'il attaque des molécules du soi, provoquant une des nombreuses *maladies auto-immunes*. (Schmit, 2011)

Les maladies auto-immunes touchent environ 5% de la population d'Europe et d'Amérique du Nord et atteignent particulièrement les femmes. Elles représentent un groupe très hétérogène de pathologies caractérisées par une activation anormale des lymphocytes T et B, la présence d'auto-anticorps et un état inflammatoire important. Les plus fréquentes sont la *polyarthrite rhumatoïde*, la *sclérose en plaques*, **le lupus érythémateux disséminé (systémique)**, la spondylarthrite ankylosante, la maladie *de Crohn*, le *psoriasis*, le *diabète de type I* et la *thyroïdite d'Hashimoto*. (Schmit, 2011)

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune non spécifique d'organe, évoluant par poussées touchant préférentiellement la femme (9 femmes pour 1 homme) jeune (10-40 ans), en âge de procréer. Elle est caractérisée par des manifestations très polymorphes sur le plan clinique (« *tous les organes peuvent être touchés* »). Sa prévalence est variable d'un pays à l'autre allant de 15 à 50 cas pour 100 000 habitants. (D'Cruz *et al.*, 2007).

Cette affection est caractérisée par une efflorescence d'auto-anticorps (Ac), l'activation du complément et les dépôts de complexes immuns, ceux-ci provoquent des lésions à multiples organes : la peau, le système nerveux, les articulations et surtout le rein (Mathian et Koutouzov, 2008).

Dans le cadre de notre projet de master, réalisé au niveau de l'hôpital central de l'armée (HCA) d'Aïn Naadja, service immunologie. Il nous a été proposé d'explorer le sérum des patients atteints de Lupus en vue de déterminer des marqueurs biologiques. Nous nous sommes particulièrement intéressés :

- à la recherche des anticorps anti-nucléaires (AAN) et l'identification de la cible de ces derniers par la recherche d'AgS nucléaires insolubles comme le DNA et AgS solubles tels que : Ro/SSA, La/SSB, SM et RNP, plus le dosage des fractions C3 et C4, car ils semblent être les marqueurs sériques les plus caractéristiques du LES.
- établir le profil épidémiologique, clinique, immunologique et évolutif de cette maladie et d'essayer d'identifier les facteurs de mauvais pronostic chez nos patients.
- déduire une éventuelle association à d'autres maladies, si oui les quels ?
- Peut-on déduire une démarche diagnostique devant une suspicion ?

I.1. Les maladies auto-immunes

I.1.1 Définition

Les maladies auto-immunes représentent aujourd'hui la troisième cause de mortalité après les affections cardio-vasculaires et les cancers (Schmit, 2011). Elles touchent entre 7 et 10% de la population mondiale dont plus de 80 % sont des femmes dont elles réduisent de quinze ans, en moyenne, l'espérance de vie. Le coût humain et financier de ces maladies est donc important. Malgré leur différence dans l'expression clinique et les organes concernés, elles forment une seule famille ayant en commun le même mécanisme de constitution : le système immunitaire s'attaque aux propres constituants de l'organisme comme s'ils étaient des substances étrangères (Agouti *et al.*, 2006). Face à ce phénomène, les solutions que propose la médecine n'apportent que de médiocres résultats accompagnés d'effets secondaires inquiétants (Meyer, 2011).

I.1.2. Classification

On distingue deux types de maladies auto-immunes :

- **Maladie auto-immunes spécifique d'organes** : Elles sont causées par la destruction d'un seul organe. Parmi celles-ci on peut citer le *diabète insulino-dépendant* causé par un dérèglement du système immunitaire qui s'attaque aux cellules pancréatiques productrices d'insuline (Chapel *et al.*, 2004).
- **Maladies auto-immunes non spécifiques d'organes** : Ces maladies auto-immunes systémiques touchent plusieurs parties du corps. Parmi celles-ci on peut citer *l'arthrite rhumatoïde* (Atteinte des principales articulations) et *le lupus érythémateux systémique*. Ce dernier cas est encore plus typique car la maladie touche les articulations, la peau, les vaisseaux, les reins, les poumons, le cœur, et le tube digestif. (Chapel *et al.*, 2004).

On observe au cours de l'évolution de nombreux syndromes de chevauchement avec l'association de plusieurs maladies auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organes, probablement en raison de l'existence d'un terrain immunogénétique commun à ces différentes maladies.

I.1.3. Mécanismes physiopathologiques de l'auto-immunité

- ✓ **Anomalie de la présentation des antigènes (Ag) par le système HLA**
- ✓ **Anomalie intrinsèque de l'auto-antigène**
- ✓ **Anomalie de production des cytokines** (Ségalen *et al.*, 2011)

I.2. Le lupus érythémateux systémique

I.2.1. Définition

Le lupus est aujourd'hui considéré comme l'archétype de la maladie auto-immune non spécifique d'organe avec un tableau clinique très polymorphe, c'est une maladie auto-immune chronique de la famille des connectivites, caractérisée par l'atteinte inflammatoire non spécifique de différents organes et plus particulièrement de la peau, des articulations, des glomérules rénaux, des séreuses, du système nerveux central et des vaisseaux (D'Cruz *et al.*, 2007)

La première utilisation du terme lupus dans la littérature remonte au 10^{ème} Siècle de notre ère (Mallavarapu *et al.*, 2007). Le nom lupus érythémateux disséminé, qui englobe les symptômes cardiaques, pulmonaires, rénaux et cutanés associés à la maladie, fut suggéré en 1894 par Sir William Osler (Mallavarapu *et al.*, 2007).

Le nom de cette maladie vient de l'aspect classique des lésions dermatologiques de la région faciale en masque de loup (en latin : *lupus*) vénitien (lésion érythémateuse s'étendant de la racine du nez vers les pommettes en forme d'aile de papillon) (Mallavarapu *et al.*, 2007).

I.2.2. Classification

Le lupus cutané isolé (ou « pur ») est une maladie le plus souvent chronique parfois invalidante, mais ne compromettant pas le pronostic vital. Le lupus cutané isolé n'entre pas dans le cadre de l'ALD 21.

À l'inverse, le LES est une maladie extrêmement protéiforme, durable, dont la gravité est variable en fonction de la sévérité des organes atteints.

Au sein des LES, on distingue les lupus induits (syndromes lupiques d'origine médicamenteuse) des LES spontanés.

La classification de référence des LES est celle de l'*American College of Rheumatology* (ACR) (**Annexe 1**). Elle a été élaborée à partir de patients ayant une maladie à expression rhumatologique ; elle permet de distinguer les patients lupiques des patients atteints d'autres maladies inflammatoires systémiques (essentiellement polyarthrite rhumatoïde).

Ce vaste éventail de symptômes pouvant être associés au LES en fait une maladie souvent difficile à diagnostiquer (Rahman et Isenberg, 2008).

Les premiers critères diagnostiques pour le LES ont été établis en 1971 (Canoso et Cohen, 1979).

Ces critères diagnostiques ont été révisés en 1982, afin d'inclure les résultats des nouveaux tests sérologiques (AAN et anti-ADN natifs) effectués pour le dépistage (Tan *et al.*, 1982).

Il est communément admis qu'un patient est atteint de LES lorsqu'il remplit **quatre critères** au moins, simultanément ou successivement, des critères révisés de l'American College of Rheumatology (ACR) (**annexe 1**). (Hochberg, 1997).

I.2.3. Epidémiologie

Le Lupus est une affection relativement rare mais il existe des variations importantes selon le sexe et l'origine ethnique. Le LES affecte préférentiellement les femmes (Le sex-ratio étant de neuf femmes pour un homme) jeunes (20-40ans) en âge de procréer. Sa prévalence se situe, selon les études, entre 7 et 159 cas pour 100 000 habitants. Il revêt un caractère familial dans 5 à 10% des cas (Contin-Bordes *et al.*, 2009).

I.2.4. Etiologie

D'un point de vue étiologique, la maladie lupique est une affection auto-immune dont l'origine reste encore discutée. De nombreux facteurs génétiques, endocriniens (déséquilibre ostrogénique), environnementaux (exposition aux ultraviolets) et immunologiques pourraient contribuer au déclenchement et à l'entretien de la maladie. (Meyer, 2010).

a) Facteurs génétiques

De nombreux arguments plaident en faveur du rôle prépondérant de la prédisposition génétique. On considère que plus de 100 gènes pourrait être incriminés dans la détermination génétique du lupus (Meyer et Kahn, 2000).

Il existe des cas familiaux dans 2 à 5 % des cas avec, en cas de jumeaux monozygotes, une concordance de l'ordre de 30 %. Il est intéressant de noter que dans certaines familles, si l'on ne retrouve pas d'authentique lupus, plusieurs autres membres de la famille sont atteints d'autres maladies auto-immunes : polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Gougerot-Sjögren, thyroïdite, ce qui suggère qu'il n'y a pas de gène totalement spécifique d'une maladie auto-immune.

Différents facteurs génétiques ont été précisément décrits dans le lupus, en particulier les gènes des protéines du complément (C1q, C2, C4), les gènes associés à l'haplotype A1 B8 DR3. Il existe vraisemblablement d'autres gènes intervenant dans la réaction immunitaire dont certains sont portés par le chromosome 1 (1q23). (Meyer et Kahn, 2000)

b) Facteurs d'environnements

Les facteurs d'environnement les plus influents dans cette maladie sont certainement les rayonnements ultraviolets (UV) capables d'induire des lésions cutanées mais également des poussées évolutives de la maladie. Les facteurs toxiques (tartrazine) ou des médicaments peuvent également avoir un rôle, mais ne sont responsables que d'une minorité (moins de 10 %) de maladies lupiques. Le rôle d'agents infectieux, en particulier viraux (rétrovirus), est suggéré par l'étude de modèles animaux, mais il n'a jamais été démontré formellement chez l'homme et leur mécanisme d'action est inconnu (Kahn *et al.*, 2000)

c) Facteurs endocriniens ou hormonaux

Ces facteurs sont particulièrement importants dans le lupus car la prise d'œstrogènes (pilule contraceptive, hormonothérapie substitutive) ou la grossesse peuvent déclencher une poussée de la maladie (Canonne, 2001). Ces facteurs hormonaux expliquent aussi la gravité des lupus masculins survenant chez les patients atteints de syndrome de Klinefelter et le rôle bénéfique, au moins expérimental, de l'hormonomodulation anti-œstrogénique (Canonne, 2001).

d) Facteur médicamenteux

La prise de certains médicaments peut induire des manifestations cliniques et biologiques du lupus. La liste des médicaments inducteurs ne fait que croître (**annexe 7**) mais les principaux produits responsables sont : le procainamide, l'hydralazine, l'isoniazide, les bêta-bloquants, la D-pénicillamine, la quinidine, la sulfasalazine et la minocycline (Khan *et al.*, 2000)

Les manifestations cliniques induites sont assez proches de la maladie lupique spontanée, s'en distinguant par une moins grande sévérité, la rareté de l'atteinte rénale, et en règle générale la régression plus ou moins totale à l'arrêt du produit inducteur (Khan *et al.*, 2000).

I.2.5. La physiopathologie du LES

La physiopathologie du LES est complexe et non univoque. Les causes précises de la maladie restent, à ce jour, inconnues. Il est néanmoins avéré que le système immunitaire des patients lupiques est activé de façon anormale et que ce dysfonctionnement est au cœur de la physiopathologie de la maladie. Ainsi des découvertes toutes récentes (Blanco *et al.*, 2008) ont permis de progresser dans la connaissance des mécanismes immunologiques impliqués et de préciser de nouvelles cibles thérapeutiques (Blanco *et al.*, 2008).

Le lupus érythémateux systémique fait partie des maladies inflammatoires du tissu conjonctif, qui regroupent un ensemble d'affections hétérogènes constitué également des dermatomyosites, des polymyosites (Chérin *et al.*, 2005) ainsi que des sclérodermies.

Il est, en effet, le plus fréquent des connectivites après le syndrome de Sjögren-Gougerot (Beyne-Rauzy, 2009).

- L'origine auto-immune du LES s'accompagne d'une hyperactivité lymphocytaire T et B conduisant à la production d'auto-anticorps dirigés contre de nombreux auto-antigènes, qui peuvent être des molécules intracellulaires, membranaires ou des protéines plasmatiques. La liaison des auto-anticorps aux antigènes cibles forme des complexes immuns circulants ou tissulaires, ces complexes activent la voie classique du complément et activent les cellules leucocytaires. Donc la maladie lupique apparaît à la fois comme une maladie auto-immune et comme une maladie à complexes immuns (kahn *et al.*, 2000).
 - l'apoptose : au cours du lupus il existe un excès d'apoptose et surtout une diminution de la capacité des cellules macrophagiques à phagocyter les particules apoptotiques. Dans les circonstances où les cellules en apoptose ne seraient pas rapidement éliminées, il a été proposé que ces modifications des protéines du soi aboutissent à la rupture de la tolérance vis-à-vis de certains auto-antigènes,

différentes molécules sont impliquées dans l'opsonisation physiologique des cellules apoptotiques; citons les protéines du complément c3, c4, c1q et la protéine réactive C(CRP), ces cellules opsonisées sont ainsi capable de fixer les récepteurs spécifiques des macrophages et des cellules dendritiques immatures et induisent une réaction de type non inflammatoire avec production de cytokines type IL10 ou TGFβ (Meyer, 2010).

En cas de déficit (fonctionnel ou pondéral) en opsonines, les cellules apoptotiques vont devoir suivre une autre voie de phagocytose, aboutissant à une réaction inflammatoire avec notamment la production d'IL1, TNFα et IL12. Cette réaction induit la différenciation des cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigènes, qui vont activer les lymphocytes T auto-réactifs et les lymphocytes B par l'intermédiaire de la cytokine BlyS (Meyer, 2010). La description des mécanismes d'apoptose (figure 1), si elle n'explique pas toute la physiopathologie du lupus, contribue toutefois à une meilleure compréhension de la pathogénie de cette maladie.

La physiopathologie du lupus systémique garde comme pierre angulaire les anomalies de l'apoptose et la production de cytokines de type IFNα/β et BAFF par les cellules dendritiques activées par les antigènes des cellules en apoptose. Les récents progrès de la génétique soulignent la multiplicité des gènes favorisant la survenue d'un lupus dont certains interviennent dans l'immunité innée (production d'IFN par les cellules dendritiques), d'autres dans l'immunité humorale (auto-anticorps anti-ADN natif et anti-nucléosomes), d'autres encore dans l'immunité à médiation cellulaire (Th1 et Th17) à l'origine de l'inflammation lupique. (Meyer,2010)

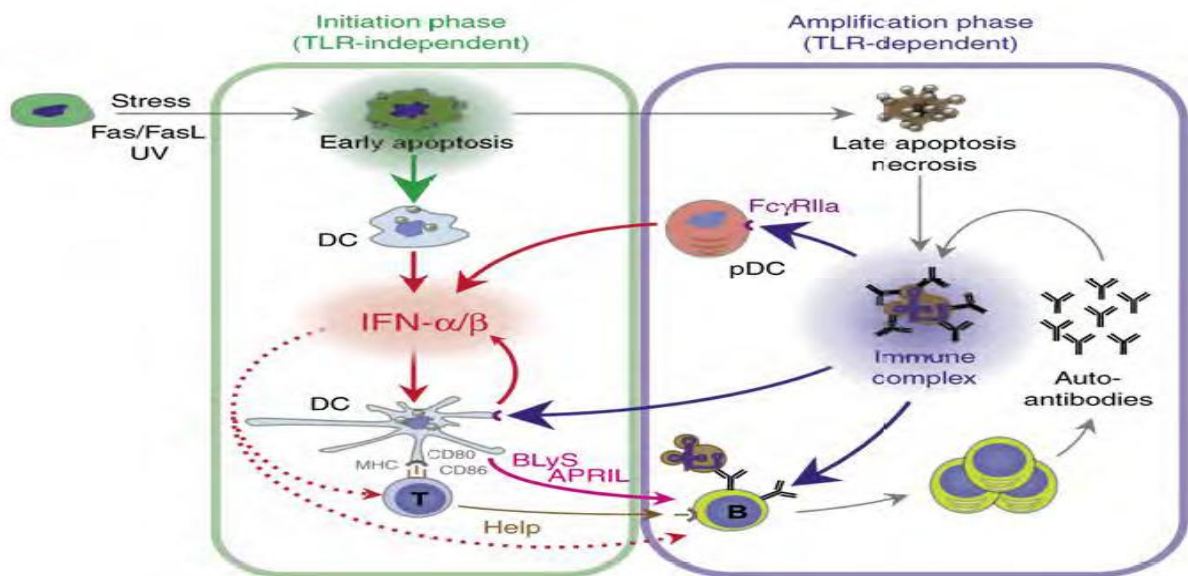


Figure 1 : La physiopathologie du LES (Meyer, 2010)

I.2.6. Le rôle des cytokines dans la physiopathologie du lupus

Les cytokines constituent un des pivots de la réponse immunitaire pathologique permettant aux populations cellulaires du système immunitaire de s'engager dans le processus d'agression du soi qui définit l'auto-immunité (Viallard *et al.*, 2000).

A cet égard, il ne s'agit pas d'un sujet nouveau, et les cytokines ont été largement étudiées dans les maladies auto-immunes. On considère schématiquement que la réponse immunitaire de type Th1 dominante (caractérisée par la production d'IFN γ) est impliquée dans les maladies auto-immunes spécifiques d'organe alors qu'une réponse dominante de type Th2 (avec élévation de l'IL-6 et de l'IL-10) serait plutôt impliquée dans les maladies auto-immunes systémiques comme le LES (Mathian et Koutouzov, 2008).

- **analyse de la production des cytokines au cours du LES (tableau 1)**

Tableau 1 : Le profil de sécrétion des cytokines au cours du LES

Les cytokines de type Th2	Les cytokines de type Th1
IL-10 : stimule la prolifération et la différenciation des Lymphocytes B et inhibe la synthèse des NK	IL-12 : sont à des taux très bas chez les patients lupiques, c'est un puissant inducteur d'IFN- γ
IL-6 : rôle dans la stimulation des LB et la production d'anticorps pathogènes	IFNγ : Un déficit en IFN- γ laisse l'intervention d'une réponse de type Th2 avec une stimulation lymphocytaire B
IL-4 : favorise la différenciation des LB en cellules sécrétrices de d'IgG1 et IgE	IL-2 : les patients avec un LED actif auraient moins de cellules sécrétant l'IL2

Le schéma suivant résume la physiopathologie du LES (**figure 2**)

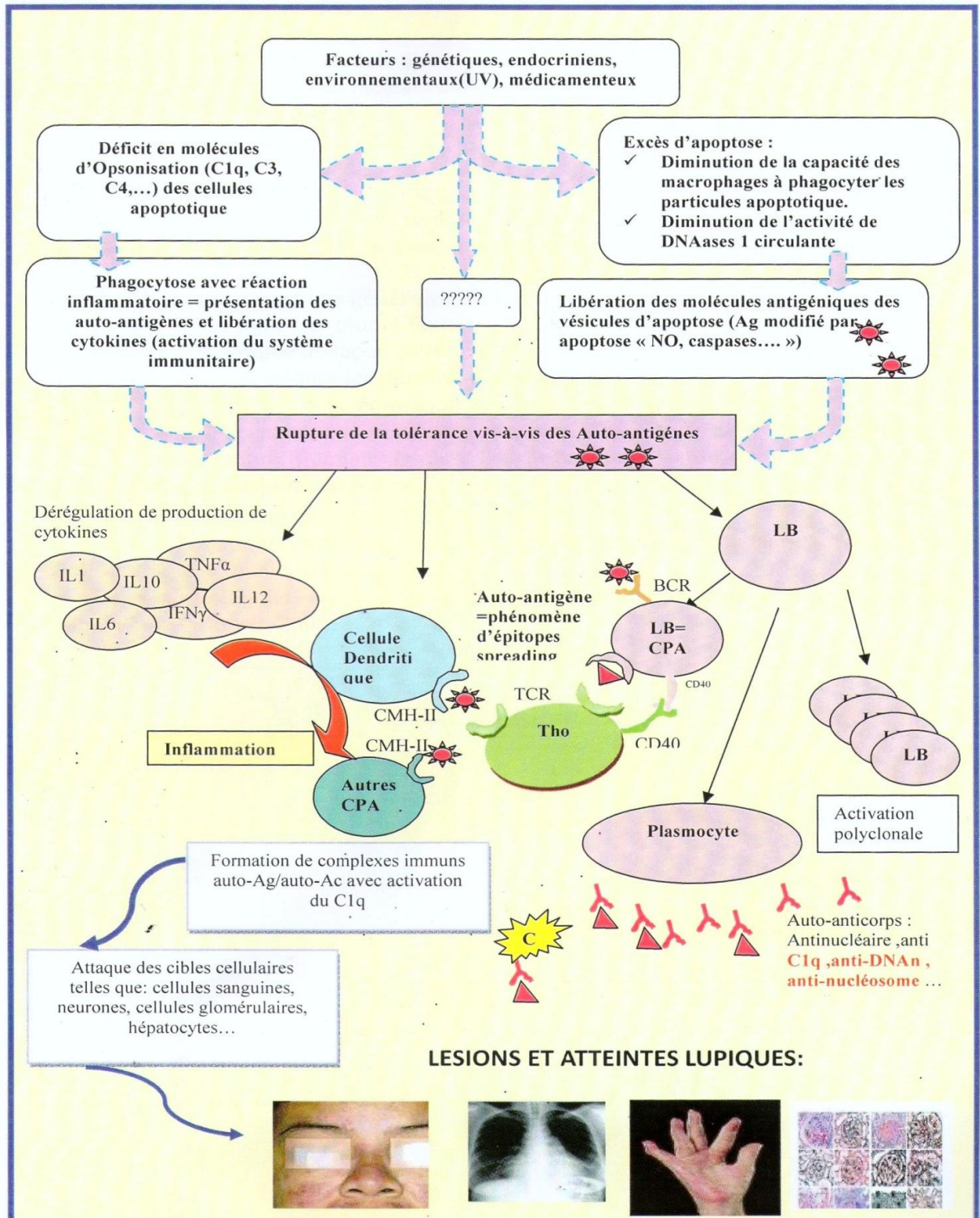


Figure 2 : Schéma général de la physiopathologie du lupus érythémateux systémique.

I.2.7. Critères du diagnostic

Le diagnostic et la surveillance de l'évolution du LES reposent sur l'association de signes cliniques et biologiques.

I.2.7.1 Diagnostic clinique

Le LES s'accompagne de signes cliniques tellement variables que son diagnostic est parfois difficile. On a recours alors aux critères cliniques et biologiques définis par ACR (voir annexes1) (Guerrier *et al.*, 2007).

I.2.7.1.1. Les manifestations générales du LES (figure 3)

La fièvre est le signe le plus fréquent au cours du LES (50 à 80% des cas). Elle s'accompagne de fatigue de façon constante, et parfois de perte de poids (Meyer, 2005).

Parmi les signes systémiques les plus fréquents on peut citer :

- Les manifestations cutanéomuqueuses comprenant un érythème malaire, un lupus discoïde d'une zone exposée au soleil, une photosensibilité et des ulcérations orales.
- Des manifestations rhumatologiques définies par des Arthrites non érosives de deux articulations périphériques au moins.
- Des manifestations respiratoires telles que la pleurésie.
- Des manifestations vasculaires, on peut citer les thromboses veineuses. La manifestation cardiaque la plus fréquente est la péricardite.

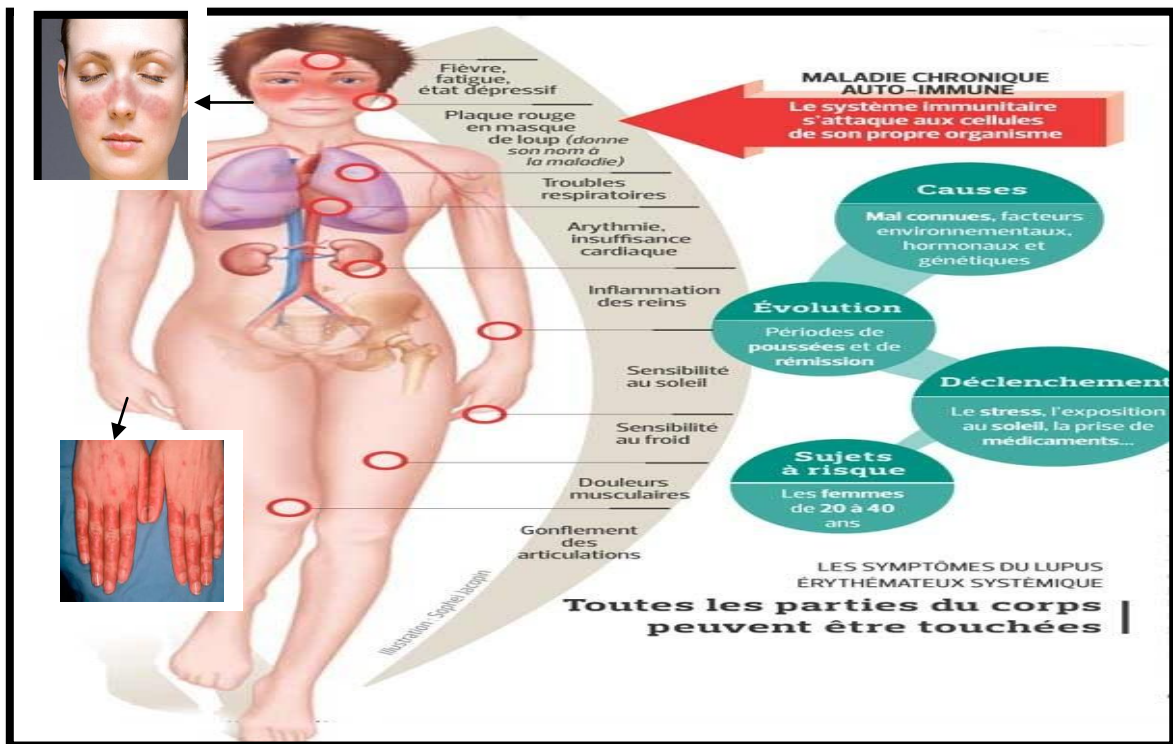


Figure 3 : Représentation schématique de l'atteinte systémique polymorphe au cours du lupus.

I.2.7.2 diagnostic Biologique

Les examens biologiques revêtent un double intérêt au cours du lupus : un intérêt diagnostique puisque deux critères sur onze leur sont consacrés, en dehors des manifestations hématologiques, et un intérêt pronostique car certaines modifications suivent l'évolutivité de la maladie et constituent ainsi un paramètre objectif pour le suivi par le clinicien.

➤ Anomalies biologiques :

A. Le syndrome inflammatoire

Les poussées lupiques sont généralement accompagnées par un syndrome inflammatoire net ; élévation de la VS, hyperfibrinémie, hyperalpha2-globulinémie.

- La CRP s'élève peu, sauf en cas d'infection concomitante.
- L'électrophorèse peut montrer une hypoalbuminémie, une hyper et une hypergammaglobulinémie. Une leucopénie est souvent observée, par neutropénie et/ou lymphopénie, ainsi qu'une thrombopénie d'origine dys-immunitaire (Rahman et Isenberg, 2008)

B. La néphropathie lupique

la NL est la complication la plus fréquente et la plus grave caractérisant le LES elle survient chez 30 à 75% des patients lupiques (Cervera *et al.*, 1999). Cette complication consiste le plus souvent en une atteinte glomérulaire, responsable d'une protéinurie, d'un syndrome néphrotique et parfois une insuffisance rénale, comme le tableau clinique ne permet pas de soupçonner la sévérité des lésions glomérulaires, la biopsie rénale reste indispensable. Les lésions tissulaires et glomérulaires observées seraient générées par dépôt d'immuns complexes et sont classées par les sociétés internationales de néphrologie et d'anatomopathologie rénale en 5 classes (Weening *et al.*, 2004).

Les principaux Ag cibles d'anticorps incriminés dans la NL sont : ADN natif, nucléosome, C1q, α actinine, laminine.

C. Les auto-anticorps (tableau 2) :

Dans le cas du LES Le système immunitaire produit des anticorps (auto-anticorps) qui s'attaquent à une gamme étendue de molécules du soi, notamment aux histones et à l'ADN libérés par la dégradation normale des cellules du corps.

Tableau 2 : Les principaux anticorps du lupus.

LUPUS ERYHTEMA TEUX Disséminé	LUPUS MEDICAMENTEUX
-Ac anti-nucléaires (ACAN):	-anti-nucléaires (ACAN)
-Ac anti-ADN natif	-Ac anti-histones
-Ac anti-nucléosome	-Ac anti-ADN dénaturés
-Ac anti-ENA (<u>Sm</u> , RNP, SSA)	
-Ac anti-ribosomes	
- Complexes immuns circulants	

Examens initiaux

Les examens suivants seront demandés initialement :

Un dosage du taux de facteurs antinucléaires (**FAN= facteur anti-nucléaire**).

- Les anticorps anti-noyaux (**AAN**) sont détectés par immunofluorescence indirecte sur des cellules tumorales humaines en culture (**figure 4**). La fluorescence peut être homogène, périphérique ou mouchetée. Leur présence à titre élevé (> 1/160e) est constante mais peu spécifique. En effet, ces anticorps sont retrouvés dans de nombreuses autres pathologies immunitaires.

L'IFI nucléaire adopte trois aspects principaux (Youninou *et al.*, 2008) : homogène, moucheté et nucléolaire.

- **Homogène (figure 4A)** : oriente vers des cibles insolubles : ADN, histone et nucléosome. Il traduit le plus souvent la présence d'anticorps anti-DNA natif mis en évidence par IFI sur *crithidia luciliae* (Ségalen, 2011). La présence de ces anticorps est spécifique au lupus érythémateux systémique, les titres les plus élevés correspondent aux formes poly-viscérales, et aux formes avec atteinte rénale. Les titres les plus faibles aux atteintes articulaires et cutanées (Ségalen, 2011).
- **Moucheté (figure 4B)** : traduit habituellement la présence d'anticorps anti-antigène nucléaires solubles aussi appelés anti-ENA, dont les plus spécifiques du LES sont les anti-Sm, qui ne sont retrouvés que dans 20 à 40% des cas. D'autres anticorps anti-antigènes nucléaires solubles sont observés au cours du LES, tels que les anti-SSA et anti-SSB (Youninou *et al.*, 2007).
- **Nucléolaire (figure 4 C)** : témoigne d'une cible nucléolaire (Ségalen, 2011). Très rare dans le LES plus fréquent dans la sclérodermie.

➤ **Périphérique (figure 4d)** : rare mais plus spécifique (ADN natif).

-Toutefois, la corrélation entre l'aspect de l'IFI et la nature de l'Ag est souvent inconstante, les aspects peuvent se superposer quand plusieurs ANA coexistent dans le même sérum. De plus, une fluorescence cytoplasmique ne doit pas être négligée, car elle peut être due à des Ac anti-SSA, des Ac anti-ribosomes, des Ac anti cytosquelette ou à des Ac anti mitochondries (Ségalen, 2011).

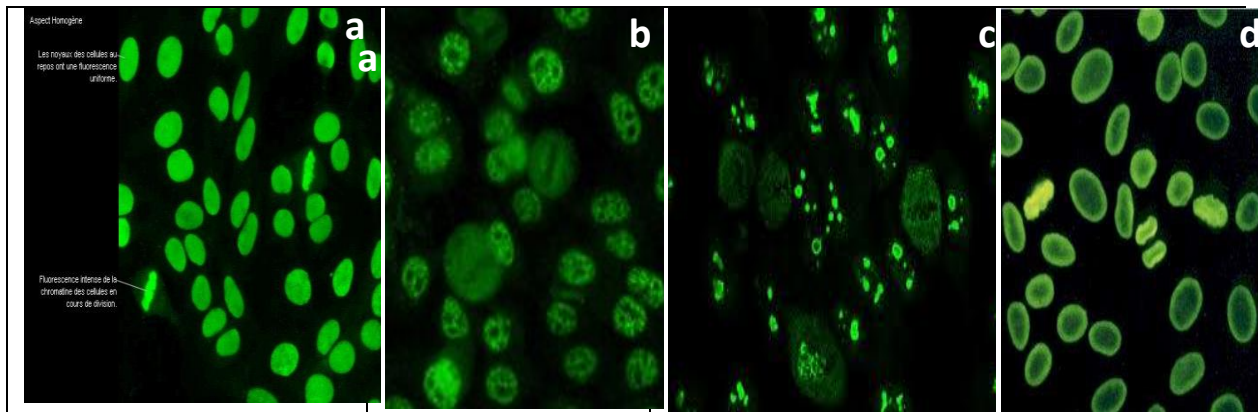


Figure 4 : Les 4 aspects de fluorescence par IFI sur les cellules Hep2.

a : Homogène. b : Moucheté. c : Nucléolaire. d :Périphérique

Le tableau 3 décrit l'aspect des cibles antigéniques révélées par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI).

Tableau 3 : Différents aspects de fluorescence en fonction des cibles antigéniques reconnues par les auto-anticorps (aspects sur cellules hep-2).

Aspect de fluorescence nucléaire	Cibles antigéniques potentiels
Homogène	Antigènes chromatinien: -ADN -histones -nucléosome
Moucheté : -grains moyens -grains fins isolés -grains fins denses -hétérogène	Antigènes nucléaires solubles: -RNP, Sm -SSA -SSB, KU -PCNA

La présence de FAN ne constituant qu'un test d'orientation. Il est indispensable de préciser leur spécificité par :

- La présence d'**anticorps anti-DNA natif** (ADN double brin ou bicaténaire). Ils se recherchent par le test radioimmunologique de FARR, l'immunofluorescence sur *Crithidia luciliae*, ou en test ELISA. Moins sensible que l'étude des FAN (60 à 80%) mais beaucoup plus spécifique du LES. (Croquefer *et al.*, 2006).

- les anticorps spécifiques d'antigènes nucléaire solubles (Ac anti-ENA) sont détectés par immunoblot, Elisa ou luminex. On en distingue divers types, parfois associés :

- Les **anticorps anti-Sm** sont peu fréquents (20 %) mais très spécifiques.
- De nombreux autres anticorps non spécifiques du lupus peuvent être rencontrés : (anti - SSA, anti-SSB, anti-RNP). (Haddouk *et al.*, 2005).

- **Anticorps anti-nucléosomes**

Par anticorps anti-nucléosome, on entend les auto-anticorps qui reconnaissent les brins d'ADN natif et/ou les histones quand ils sont associés au sein des nucléosomes, mais ni les un ni les autres quand ils sont séparés. Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, est composé d'ADN en double hélice et d'histones. Ces nucléosomes jouent un rôle très important dans la physiopathologie du LES (Koutouzov *et al.*, 2004). Ils sont fréquents chez les patients atteints de LES. Leur recherche n'a d'intérêt qu'en absence d'anticorps antiADN natif. Ils ont un effet pathogène dans la glomérulonéphrite lupique (Berden, 2002).

- **Les auto-anticorps anti-C1q**

Les auto-Ac anti-C1q seraient impliqués dans l'amplification du processus pathogène en se liant avec le C1q des complexes immuns circulants déposé sur le glomérule ou formé in situ. Ces auto-Ac augmenteraient l'activation du complément. Ainsi, on observe une hypocomplémentémie profonde (baisse de C3, C4 et CH50). Leur présence est plus fréquente en cas d'atteinte rénale et leur absence serait synonyme d'un bon pronostic puisqu'elle garantit une absence d'atteinte glomérulaire sévère (Ségalen, 2011).

- **Anticorps anti-histones**

Leur recherche est souvent demandée pour aider au diagnostic de lupus induit par les médicaments. Cependant, si ces anticorps sont présents chez environ 90 % des patients avec lupus induit, ils sont aussi fréquemment observés chez les patients avec LES ou présentant d'autres pathologies auto-immunes, comme la polyarthrite rhumatoïde. Leur valeur diagnostique est donc limitée (Ghedira *et al.*, 2006)

✚ Divers auto-anticorps distincts des FAN sont souvent rencontrés :

- Facteurs rhumatoïdes (20%), anti-plaquettes, cryoglobulinémie, anticoagulant circulant, anti-lymphocytes, anti phospholipides.

D. Le complément

Le complément joue un rôle important dans l'élimination des immuns complexes. De ce fait, l'exploration du complément total des fractions C3 et C4 fait classiquement partie des examens de surveillance immunologique du lupus puisque une hypo-complémentémie est signalée chez 40 à 60% des maladies lupiques (Meyer, 2010). Il s'agit au mieux d'un marqueur devant faire redouter une atteinte rénale lorsqu'il s'abaisse.

- Les poussées lupiques sont très souvent associées à une activation de la voie classique du complément : chute des fractions C3 et C4.

I.2.7. Traitement

Pendant des décennies, le LES a été considéré comme une affection gravissime, fréquemment mortelle. Mais de nos jours, la meilleure connaissance des manifestations cliniques, l'évolution des méthodes diagnostiques, et également la meilleure prise en charge thérapeutique ont contribué à un meilleur contrôle de la maladie et de ce fait à une amélioration des conditions de vie des patients lupiques.

Les traitements du LES existants à l'heure actuelle sont principalement à base de corticoïdes et d'immunosuppresseurs, ils interviennent en situation de crise pour soulager les symptômes mais ne guérissent pas la maladie (Fakhouri et Lesavre, 2008).

✚ Les nouvelles approches thérapeutiques

1. **Les inhibiteurs du lymphocyte B :** Du fait du rôle majeur des Ly B dans la pathogénie des maladies auto-immunes, leur inactivation par des inhibiteurs spécifiques a été envisagée.

Quatre voies sont à l'étude :

-déplétion des Ly B par anticorps anti-CD20 et anti-CD22, tolérogènes spécifiques du Ly B (LJP 394) et edratide (vaccination peptidique) (Bosly A.2006).

-L'inhibition du système B Lymphocyte stimulator (BLyS) est actuellement possible grâce à un anti-BLyS :belimumab (Benlystat®) qui est commercialisé pour une indication plus générale. (Gandhi *et al.*, 2008)

Parmi ces molécules anti-B, se dégagent des molécules inhibitrices d'une cytokine majeure appelée BAFF. Les anticorps monoclonaux **anti-BAFF**, des récepteurs solubles, comme TACI-Fc (protéine de fusion combinant le récepteur TACI et un fragment Fc d'immunoglobuline) sont en cours d'évaluation.

2. **Les inhibiteurs de la costimulation :** Les cellules présentatrices d'antigène expriment différentes molécules de costimulation qui interagissent avec des molécules à la surface des lymphocytes T LyT. Ces costimuli sont nécessaires à l'activation des Ly T et constituent de ce fait des cibles privilégiées. Plusieurs thérapeutiques sont en cours d'étude : anti-CD40 ligand, et le CTLA-4 Ig (abatacept: Oencia®).

L'abatacept une protéine de fusion formée du CTLA4 et d'un fragment d'immunoglobuline. Le CTLA4 est une molécule de costimulation qui donne au lymphocyte T un signal négatif inhibant son activation. Cette molécule a été évaluée dans la polyarthrite rhumatoïde, justifiant une AMM dans cette indication (Gandhi *et al.*, 2008).

Cette molécule est également évaluée dans d'autres affections auto-immunes systémiques, en particulier le lupus.

Sa tolérance est bonne. Il existe un risque faible d'intolérance allergique. Le risque infectieux est limité et il n'y a pas de preuve établie de risque néoplasique.

3. **Les immunomodulateurs cytokiniques** : permettant d'inhiber des cytokines clés du lupus : **Interleukine-10(IL10), Interféron α (IFN α), Interleukine-6 (IL6) et TNF**. Ces nouveaux traitements sont en cours de développement chez l'homme. (Asherson *et al.*, 2003)
4. Des inhibiteurs de la migration cellulaire :_Des molécules destinées à inhiber le recrutement des cellules pro-inflammatoires ont été développées notamment un anticorps monoclonal anti α 4-intégrine (natalizumab: Tysabri®). Pour l'instant, les anticorps monoclonaux ou les protéines de fusions dirigées contre les chimiokines et leurs récepteurs n'ont pas démontré leur efficacité.
5. **Des inhibiteurs des voies de signalisation** : Une stratégie thérapeutique prometteuse est l'utilisation de petites molécules inhibitrices des voies de signalisation intracellulaires, en particulier des facteurs de transcription NF-kB et des MAP-kinases (Francis et Perl, 2009).

Par analogie au rejet d'allogreffe d'organe, des inhibiteurs des voies de signalisation pourraient être évalués, comme le CP 669-550 qui est un inhibiteur de Janus-kinase3 (Jak 3) par voie orale (Sibilia, 2006).

Récemment, un inhibiteur de la PI3K γ (phosphatidylinositol-3'-kinase γ) a démontré une efficacité extrêmement convaincante dans un modèle d'arthrite destructrice.

Cette stratégie thérapeutique pourrait être développée dans d'autres pathologies, en particulier le lupus.

II.1 Matériel

La présente étude a été réalisée au laboratoire d'Immunologie de l'hôpital central de l'armée *Mohamed Seghir Nekkache* (HCA), Ain naadja, durant la période s'étendant du mois de mars 2013 à aout 2013.

II.1.1. Matériel biologique

a) Sérums de patients lupique et avec suspicion

Le but du présent travail a porté sur deux volets :

- Étude épidémiologique :

Une étude rétrospective, s'étalant de janvier 2012 à mars 2013 a été réalisée sur un effectif de 68 patients algériens atteints de Lupus systémique et/ou avec suspicion, constitué de 56 femmes et 12 hommes, identifiés et colligés à partir des données obtenues dans les registres (FAN) (annexe 3; tableau 4).

- Étude prospective :

Notre étude a été effectuée sur un échantillon de 40 patients, dont 20 présentaient un lupus érythémateux systémique et 10 autres étaient atteints de différentes maladies auto-immunes et qui serviront de témoins. Par ailleurs, 10 donneurs sains ont également été utilisés en tant que témoins négatifs (annexe 3; tableau 1, 2, 3)

NB : Tous les patients lupiques ont au minimum quatre critères de l'ACR, une fiche de renseignements clinique a été établie pour chaque patient après consentement écrit.

Les sérums, obtenus après centrifugation du sang à 4000 tours / minutes pendant 5 minutes. Les sérums ont été conservés à -40°C jusqu'à l'utilisation.

b) Les cellules Hep2 (humain épithélioma type 2 cells) :

Il s'agit de cellules cancéreuses de la trachée humaine, caractérisées par un noyau de grande taille qui contient plusieurs nucléoles ainsi qu'un cytoplasme abondant.

Elles sont fixées ce qui préserve les Ag nucléaires solubles (ENA), leur origine humaine assure une spécificité meilleure que les tissus d'animaux. Elles sont cultivées sur lame en couche unicellulaire, les noyaux sont donc bien visibles. La forte proportion de cellules en division permet de mieux visualiser les Ag produits seulement au moment de la mitose (tel que le fuseau mitotique), il n'y a pas de tissu conjonctif pour faire écran, ajouter à cela la distribution uniforme des Ag (Bradwell *et al.*, 2007).

c) *Chritidia luciliae* :

Les *Chrithidia luciliae* (CL) sont des protozoaires flagellés de la mouche, non pathogènes pour l'homme, appartenant aux trypanosomides. Ces parasites se cultivent aisément in vitro dans des milieux contenant du sang. Les CL contiennent un noyau, un kinétoplaste (taille et localisation nettement différenciables) et un seul flagelle effilé. Le kinétoplaste est une mitochondrie géante modifiée contenant de l'ADN bicaténaire circulaire, pauvre en histones. La contamination par les histones dépend du cycle de croissance, donc de la durée de culture du parasite. Les anticorps anti-ADN natif donnent une fluorescence intense de l'ADN circulaire de la mitochondrie (kinétoplaste).

II .1.2. Matériel non biologique

- Micropipettes calibrées (Brand)
- Tubes à essai en verre, polypropylène ou polystyrène
- Portoir pour tubes à essai
- Chambre humide
- Boîte de pétri pour le lavage des lames
- Agitateur magnétique (vortex)
- Flacon de lavage en plastique
- Microscope à fluorescence
- Centrifugeuse (jouan)
- Spectrophotomètre
- Luminex (BMD)
- Génératrice de courant réglable de type SEBIA, modèle GD251D
- Bandelettes de papier buvard
- Plaques Elisa 96 puits
- Micropipettes multi canons
- Lamelles couvre objets en verre de 24x60mm
- Eau distillée ou déminéralisée (DI-H₂O)
- Les gants en latex
- Chronomètre (AB :Applied biosysteme)
- Thermomètre
- Chambre froide
- Godés en plastique
- Néphlémètre laser de type BNA
- Embouts jetables pour micropipettes
- Eprouvettes en verre, béccher
- Lecteur Elisa (BIOTEK)

II.2.Méthodes

II.2.1.Recherche des anticorps antinucléaires et anti-ADN natif par immunofluorescence indirecte (IFI)

- **Principe :** Le sérum à tester est déposé sur une lame contenant des puits coatés avec l'antigène recherché puis le complexe ainsi formé sera marqué par un isotope fluorescent et

lu sous microscope à fluorescence. Après lavage, le complexe Ag-Ac est révélé et permet de détecter le titre d'Ac et l'aspect de la fluorescence.

- Deux types de substrats antigéniques ont été utilisés dans la technique de l'IFI : les cellules Hep2 pour la recherche des anticorps antinucléaire (AAN) et *crithidia luciliae* pour la recherche d'anticorps anti-ADN natif.

II.2.1.1. Recherche des anticorps antinucléaires par (IFI) sur cellules Hep2 (kit commercialisé BIORAD ou biosystème) (annexe 9)

- **Protocole opératoire :**

1. Sortir les lames du coffret et les laisser à température ambiante pendant 20 minutes. Eviter de toucher les puits et tenir les lames sur les bords.
2. Dilution des échantillons sériques des patients lupiques, des témoins malades et des témoins sains : au 1/80^{ème} à raison de 10µL de sérum pour 790µL de PBS.
3. Déposer 25µL des contrôles et des échantillons sériques dilués dans les puits appropriés après avoir bien vortexé le mélange
4. Laisser incuber les lames de substrats à température ambiante pendant 20 mn a 30 mn selon les firmes.
5. Lavage des lames avec une solution PBS ensuite plongé carrément la lame dans une boîte de pétri contenant de l'eau physiologique et laisser pendant 10mn.
6. jeter le liquide de lavage, séché (pas trop) la lame à l'aide de papier buvard.
7. Distribuer 25µL de conjugué marqué à la fluorescéine dans chaque puits et incuber 20mn a 30 min (selon les firmes)
8. Laver les lames dans une solution PBS pendant 10mn.
9. Montage des lames : déposer 4 gouttes de milieu de montage sur chaque lame.
10. Examiner les lames sous un microscope à fluorescence dans une chambre noire et évaluer la présence ou l'absence d'auto-anticorps dans chaque puits de substrat.
11. **Interprétation des résultats**

Les aspects à fluorescence des cellules Hep2 :

- ✚ **Résultat négatif** : absence de la fluorescence des noyaux des cellules Hep2.
- ✚ **Résultat positif** : fluorescence des cellules Hep2. Nécessite une identification de l'aspect de la fluorescence ainsi que le titre de positivité (figure 5).

Remarque : a partir de l'étape 7 jusqu'à l'étape 11, les manipulations sont faites a l'obscurité.

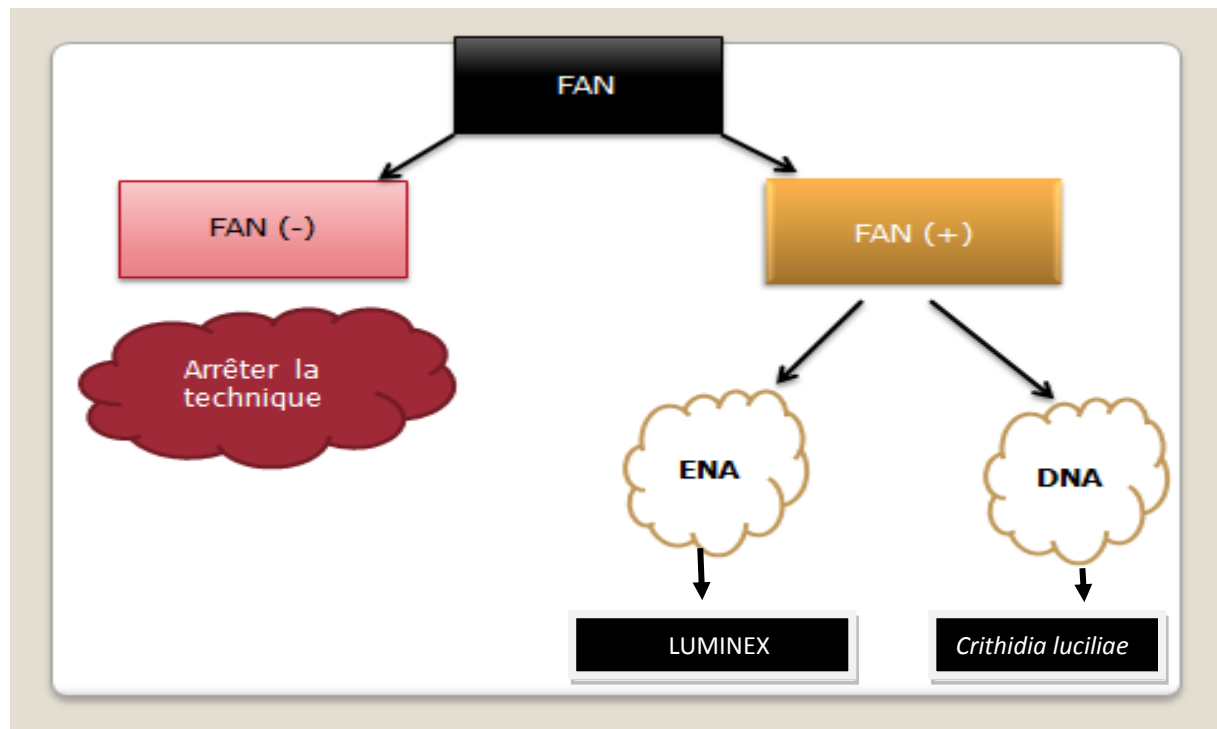


Figure 5: méthodologie suivie en fonction des résultats FAN.

II.2.1.2. Recherche des anticorps anti-ADN natifs par *Crithidia luciliae* (kit BIORAD ou biosystems)

Les anticorps anti-DNA natif (dsDNA) IgG sont recherchés en seconde intention après un dépistage et un titrage positif d'anticorps antinucléaires sur cellule Hep2 par immunofluorescence indirecte. La recherche de ces anticorps sert à confirmer le diagnostic de lupus érythémateux systémique.

- **Protocole opératoire :**

1. Dilutions des échantillons sériques des patients lupiques, des témoins malades et des témoins sains au 1/10^{ème} avec la solution PBS.
2. Déposer 25µL/30µL d'échantillons sériques dilués dans les puits appropriés puis incuber les lames de substrats pendant 20min à 30min selon le kit à température ambiante (15-30°C).
3. Laver les lames dans une solution PBS pendant 10min.
4. Distribuer environ 25µL/30µL de conjugué à la fluorescéine dans chaque puits puis incuber pendant 20min.
5. Laver les lames en l'immergeant dans une boîte de lavage remplie de PBS pendant 10min
6. Sécher avec précaution les lames en utilisant le papier absorbant fourni.
7. Ajouter 4 gouttes de milieu de montage (huile d'immersion) sur chaque lame puis les recouvrir de lamelles en évitant la formation de bulles d'air.
8. Examiner les lames sous un microscope à fluorescence dans une chambre noire.

9. Interprétation des résultats

-Un résultat négatif : se caractérise par une absence de marquage du kinétoplaste

-Un résultat positif : se caractérise par une fluorescence nette du kinétoplaste qui peut avoir un aspect plein (homogène) ou un aspect cerclé (**figure 6**). Une fluorescence isolée du noyau et ou du corps basal dans la fluorescence du kinétoplaste est un résultat négatif (Ne sont pas liées aux anticorps anti-ADNn et ne doivent ni être confondues avec celle du kinétoplaste, ni prises en compte dans l'interprétation).

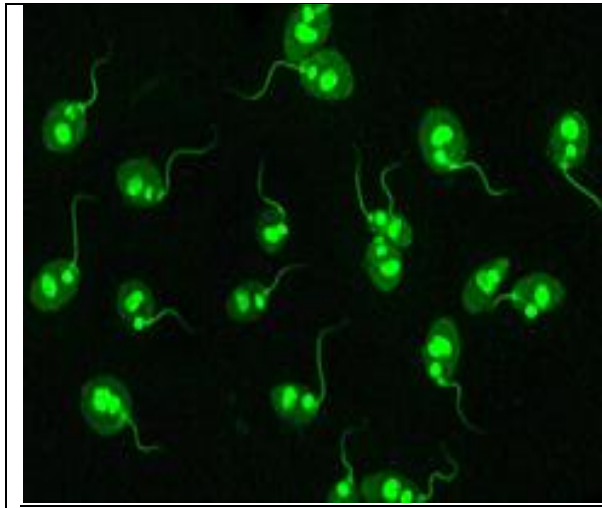


Figure 6: Le sérum d'une patiente lupique, dilué au 1/10 e, est incubé 30 minutes sur une lame contenant dans chaque puit des étalements de *Chritidia luciliae*.

Après lavage, la révélation des auto-anticorps anti-ADNn fixés au kinétoplaste du trypanosome se fait par incubation de 30 minutes avec un antiserum polyvalent anti-immunoglobulines humaines marqué à l'isothicyanate de fluorescine dilué au 1/100 e. Les lames sont lues au microscope à fluorescence : Seul le kinétoplaste est positif.

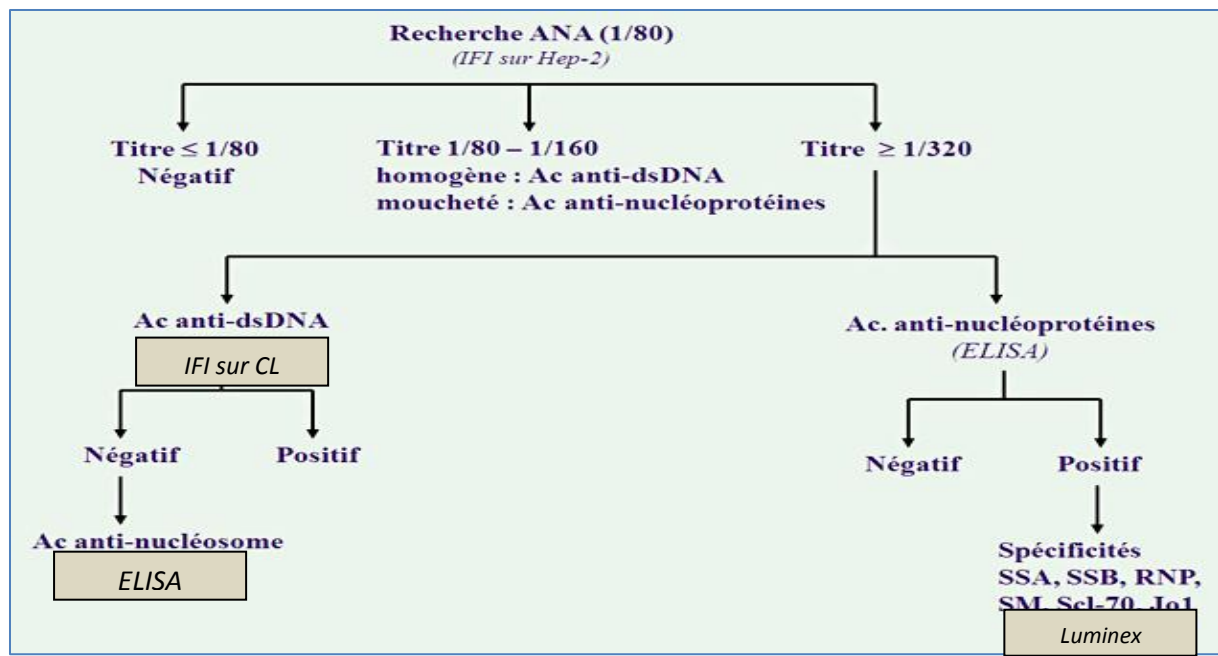


Figure 7 : Algorithme utilisé au laboratoire d'immunologie (HCA) pour la recherche des AAN.

II.2.2 dosage des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (ENA) par luminex Système Fidis (Réactif et appareillage, voir annexe 10)

Principe du test:

FIDIS connective profile repose sur l'utilisation de microsphères de tailles uniformes différemment colorées et d'un cytomètre en flux interfacé avec un système informatique de digitalisation et de traitement du signal. Une diode rouge du cytomètre en flux, en classant chaque catégorie de microsphères sur la base de sa fluorescence unique (du rouge à l'orange), permet l'identification du paramètre analysé. Parallèlement, un laser excite la fluorescence d'un composé secondaire pour quantifier la réaction spécifique qui y est associée.

-Chaque antigène nécessaire à la réalisation du test (antigène recombinants : **dsDNA, SSB, TRIM21, CENP-B, Jo-1, PmScl, PCNA et histones**, et antigène natifs purifiés : **Scl-70, SmRNP, Sm, ribosomes et SSA 60 kDa**) est couplé à une catégorie de microsphères colorées. Les différentes catégories sont ensuite mélangées pour constituer le réactif final, support des réactions immunologiques spécifiques avec les différents auto-anticorps recherchés.

Le coffret FIDIS tm connective profile permet de détecter 13 anticorps spécifiques : les Ac anti-ADN double brin (DsDNA), anti-SSA 60KDa, anti-TRIM 21, anti-SSB, anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-Scl-70, anti-jo-1, anti-ribosomes, anti-CENP-B, anti-PmScl , anti-PCNA et anti-histones.

- Le test est réalisé dans une microplaque de filtration de 96 puits.(figure 10)
- Au cours d'une 1^{ère} étape, les échantillons dilués des patients à tester sont incubés en présence des microsphères. Si l'échantillon contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer au(x) antigène(s) correspondant(s) sur les différentes catégories de microsphères.
- Après incubation, un lavage par filtration permet d'éliminer les éléments non fixés.
- Un anticorps secondaire conjugué à la phycoérythrine dirigé contre les immunoglobulines humaines **d'isotype IgG** permet de révéler les anticorps précédemment capturés.
- Une étape de lavage finale stoppe la réaction et permet d'éliminer les anticorps non liés.
- La réaction est alors mesurée par luminex qui identifie chaque type de microsphère et mesure la fluorescence moyenne des conjugués fixés.
- Un système de calibration permet, par interpolation, de définir la valeur de l'échantillon en unité arbitraire (UA/ml) sur chacune des spécificités antigéniques suivante : SSA 60KDa, TRIM 21, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl-70, Jo-1, ribosomes, CENP-B, PmScl , PCNA et histones et unité internationale (UI/ml) pour le dsDNA.
- (le contrôle et le calibrateur sont d'origine humaine).

Préparation du test

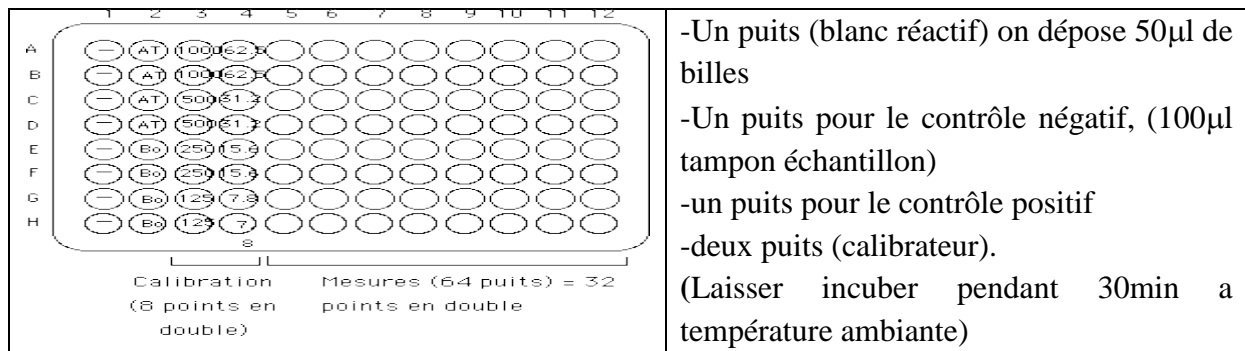


Figure 8 : microplaque de filtration

• **Mode opératoire :**

- Distribution des microsphères :** déposer 50µl de microsphère dans chaque puits (après avoir agité le flacon vigoureusement au vortex pendant 20mn)
- préparation des échantillons et des contrôles :** Diluer les échantillons et les contrôles au 1/201 dans le tampon de dilution
ex : 5µl d'échantillon dans 1000µl de tampon de dilution.
- Incubation des échantillons :** Déposer 100µl de tampon de dilution pour le blanc réactif et 100µl de contrôle dilués de calibrateur prêt a l'emploi.
- Laisser incuber 30 min à température ambiante sans agitation en évitant de la laisser sous la lumière directe.
- 1^{er} Lavage :** par une pompe qui aspire, déclencher la pompe, dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe.(lavage a deux reprises)
-retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base 10 fois sur du papier absorbant.
-placer la microplaque sur une surface totalement sèche avant de distribuer le conjugué.
- Incubation du conjugué :** déposer 100µl de conjugué et laisser incuber 30mn à température ambiante.
- 2^{ème} Lavage :** déclencher la pompe.
- Analyse :** l'effectuer conformément au manuel d'utilisation fidis™ et MLX BOOSTER™.
- Interprétation des résultats :**

Unités internationales (UI/ml)	<30 UA/ml	30-40 UA/ml	>40 UA/ml
Interprétation	Négatif	Limite*	Positif

(*)Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'exams complémentaires et du contexte clinique.

- Calcul des résultats :** les résultats sont automatiquement calculés par le logiciel MLX-BOOSTER™ et peuvent être imprimés pour chaque analyse.

II.2.2. Dosage des anticorps anti-c1q par ELISA (kit BIOADVANCE) :

- **Principe :** Le test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) se pratique sur des microplaques dont les puits sont recouverts d'Ag. Après incubation avec le sérum, on recouvre les puits avec des anticorps anti-Ig humaines couplés avec enzyme (**annexe 6**). Par la suite, on déduit enfin le titre des anticorps des échantillons à doser, puisque la densité optique de la coloration qui se développe est proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans le milieu.

- **Protocole opératoire :**

1. Dilution des échantillons au 1/51 (10µL sérum et 500µl PBS) dans du tampon échantillon (10µl pour 500µl).
2. Transfère 100µl des calibrateurs, du contrôle positif et négatif ainsi que des échantillons de patients, témoins et témoins négatifs, dilués dans les puits individualisés de la microplaque selon la disposition suivante :

Puits A1 : déposer 100µl du calibrateur 1

Puits B1 : déposer 100µl du calibrateur 2

Puits C1 : déposer 100µl du calibrateur 3

Puits D1 : déposer 100µl du témoin positif

Puits E1 : déposer 100µl du témoin négatif

P : sérums des patients dilués

Ts : sérums des témoins sains

Tm : sérums des témoins malade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	P4	P12	P20	Ts8	Tm6						
B	C2	p5	p13	Ts1	Ts9	Tm7						
C	C3	p6	p14	Ts2	Ts10	Tm8						
D	T+	p7	p15	Ts3	Tm1	Tm9						
E	T-	p8	p16	Ts4	Tm2	Tm10						
F	P1	p9	p17	Ts5	Tm3							
G	p2	p10	p18	Ts6	Tm4							
H	p3	p11	p19	Ts7	Tm5							

Figure 9 : Schéma des microplaques pour le dosage des Ac anti-C1q par ELISA

3. Incuber 30 min sur agitateurs de plaques.
4. Lavages 3 fois avec le tampon de lavage.
5. Pipeter 100 µl du conjugué enzymatique (anti IgG humain couplé à la peroxydase)
6. Incuber pendant 30 min puis faire un lavage 3 fois.
7. Pipeter 100µl de la solution chromogène / substrat dans chaque puits
8. Incuber 15min puis pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans chaque puits.
9. La mesure de la photométrie doit être faite à la longueur d'onde 450 nm.
- 10. Interprétation des résultats :** la courbe standard à partir de laquelle la concentration des anticorps dans les échantillons pourra être déterminée est

obtenue en traçant une courbe point à point reliant les valeurs DO mesurées pour les 3 sérums de calibration contre les unités de concentration correspondantes. Si la valeur de la DO de l'échantillon est supérieure à celle du calibrateur 1(200UR/ml), le résultat doit être donné comme suit :

Tableau 4 : Interprétation des résultats de l'ELISA

DO	>200 UR /ml	négatif
DO	< 20 UR/ml	négatif
DO	>20 UR/ml	positif

II.2.3. Dosage des anticorps anti-nucléosomes par ELISA (kit commercialisé Euroimmun) :

- **Protocole opératoire :**

1. Dilution de 10µl de sérum de patients, témoins et témoins négatifs pour 2000µl de diluant.

2. Sur les premier puits déposer :

Puits A1 : déposer 100µl du calibrateur 1.

Puits B1 : déposer 100µl du calibrateur 2.

Puits C1 : déposer 100µl du calibrateur 3.

Puits D1 : déposer 100µl du témoin positif.

Puits E1 : déposer 100µl du témoin négatif.

Ts : sérums des témoins sains, **Tm** : sérums des témoins malades

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	P4	P12	P20	Ts8	Tm6						
B	C2	p5	p13	Ts1	Ts9	Tm7						
C	C3	p6	p14	Ts2	Ts10	Tm8						
D	T+	p7	p15	Ts3	Tm1	Tm9						
E	T-	p8	p16	Ts4	Tm2	Tm10						
F	P1	p9	p17	Ts5	Tm3							
G	p2	p10	p18	Ts6	Tm4							
H	p3	p11	p19	Ts7	Tm5							

Figure 10 : Schéma de la microplaque pour le dosage des anti-nucléosomes par ELISA.

1. Déposer 100µl de sérum dilué des patients, témoins et témoins négatifs dans chaque puits restant de la plaque.
2. Incuber pendant 30min la plaque ELISA.
3. Lavage 3fois avec le tampon de lavage (10ml du tampon de lavage du kit avec 90 ml d'eau distillée) pendant 1 min.
4. Pipeter 100 µl du conjugué enzymatique et laisser incuber pendant 30 min.
5. Lavage 3 fois avec la solution lavage.
6. Déposer 100 µl du chromogène substrat et laisser incuber pendant 15 min.
7. Ajouter 100µl de solution stop puis lire la DO a 450nm.

8. **Interprétation des résultats** : tracer la courbe à l'aide des calibrateur et calculer les concentrations des sérums échantillons par extrapolation sur la courbe.

II.2.4. Dosage des fractions C3 et C4 par néphélométrie Laser

- **Principe** : L'immuno-néphélométrie laser est une technique de mesure optique de la formation de précipités mettant en jeu des interactions immunologiques de type Ag-Ac en milieu liquide. Elle utilise un faisceau laser et l'intensité de la lumière diffusée est recueillie par une cellule photoélectrique. Les concentrations des protéines à doser sont obtenues par extrapolation de la valeur des DO sur une courbe d'étalonnage obtenue à partir des différentes concentrations standards. L'intensité des rayons dispersés est proportionnelle à la quantité des complexes immuns formés. De ce fait, la mesure est effectuée en phase d'excès d'anticorps selon la courbe de précipitation de Heidelberger.
- **Protocole opératoire** :
 1. Prélever un volume de 400µl de sérum de chaque patient, témoin et témoin négatif et déposer dans les capsules.
 2. Disposer les cupules dans le compartiment spécifique au niveau du néphélomètre
 3. Accéder au menu principal à partir de la base de données de l'ordinateur et sélectionner l'icône liste de travail.
 4. Introduire les informations concernant les malades (numéro de référence, nom, prénom, sexe, âge, service...) et sélectionner les paramètres à doser pour chaque patient. Suivre les instructions communiquées par l'ordinateur pour que l'automate puisse fonctionner de lui-même et lancer les dosages.
 5. Revenir à l'icône principale et sélectionner << Résultats >> les résultats des dosages demandés s'affichent sur l'écran. Puis lancer l'impression des résultats.
 6. **Interprétation des résultats** : les valeurs obtenues doivent être comparées aux valeurs normales qui sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 5: valeurs normales des composantes C3 et C4

Valeurs normales (g/l)		
Composant C3	0,9	1,8
Composant C4	0,1	0,4

Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

III.1. Etude rétrospective

III.1.1. Répartition selon l'âge

L'âge moyen de la survenue de la maladie est de 32 ans avec un pic situé entre (25 et 35ans) (**figure 12**). Avec des extrêmes allant de 14 ans à 65ans. Nous avons observé un cas de lupus à début pédiatrique et deux cas où la maladie s'est déclarée à partir de 60 ans.

Chez les hommes, la moyenne d'âge du début de la symptomatologie était de 47 ans avec une médiane de 24 ans et des extrêmes de 24 et 60 ans, alors que chez la femme, elle était de 37,8 ans avec une médiane de 33,74 ans et des extrêmes de 14 et 65 ans. nos résultats semblerait être en accord avec les principales séries de la littérature (Saroux *et al.*, 2005 ; Deligny *et al.*, 2002).

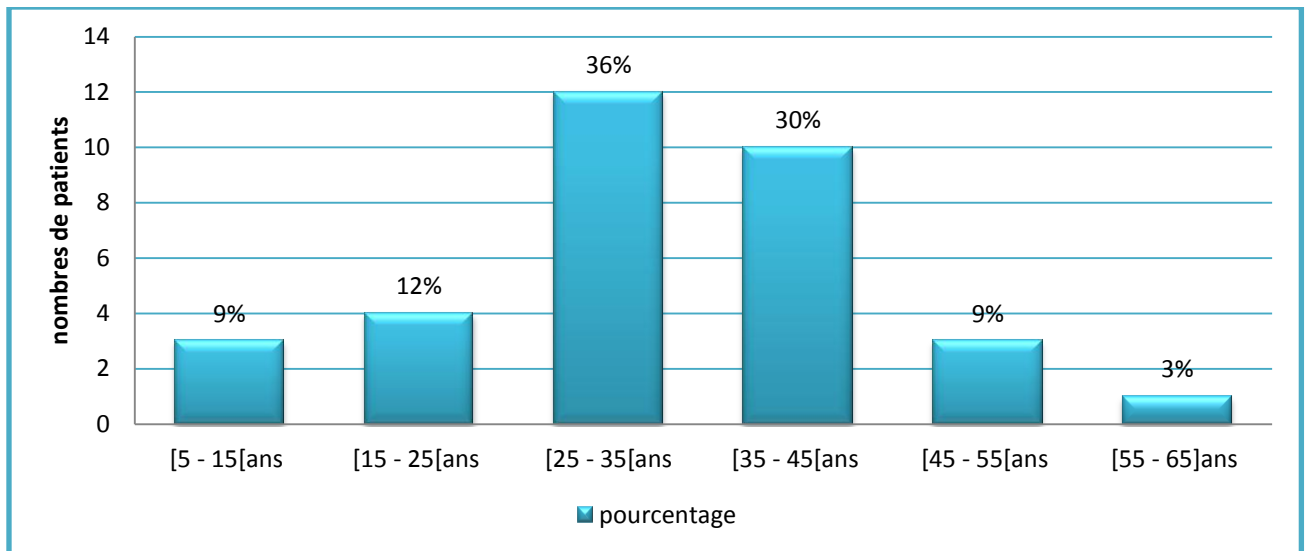


Figure 12: répartition des 68 patients selon l'âge

III.1.2. Répartition selon le sexe

La prédominance féminine est classique comme l'illustre notre série, le sex-ratio femmes sur hommes est de 6 pour 1, ce qui conforterai à l'hypothèse de l'implication de facteurs endocriniens (œstrogènes) dans l'étiopathogénie de la maladie (Haddouk *et al.*, 2005)

Les patients de notre étude, répondent aux critères révisés de l'ACR.

(**Figure 13**).

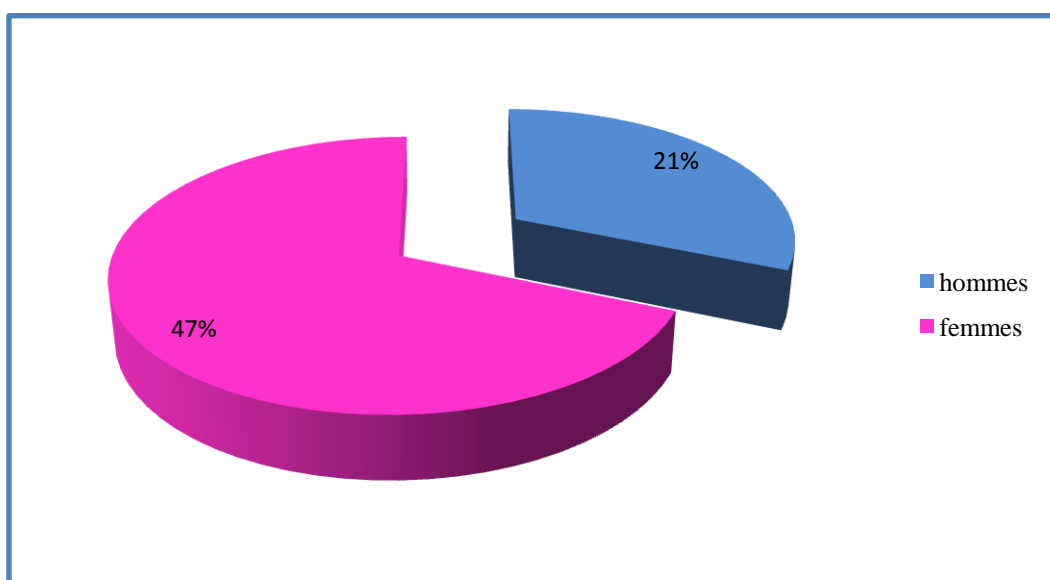


Figure 13: répartition des patients lupiques selon le sexe.

III.2. Etude prospective :

Parmi les 40 patients qui composent notre série, 4 avaient un âge inférieur à 16 ans et 7 avaient un âge supérieur à 50 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic était de 29,9 ans avec des extrêmes de 10 et 67 ans. 32 patients sont de sexe féminin et 8 de sexe masculin, soit un sex-ratio F/M égal à 6.

Nous avons étudié la répartition de nos patients selon 5 tranches d'âge, les patients étaient âgés entre 20 et 39 ans

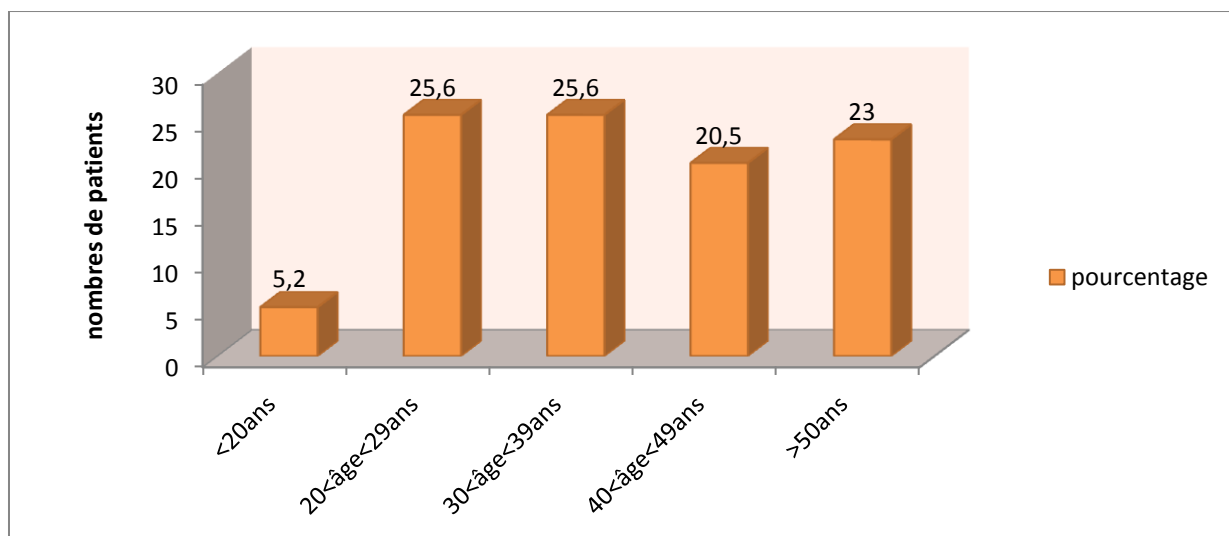


Figure14 : Répartition des cas selon les tranches d'âge

III.3 Résultats du dosage des marqueurs biologiques du LES

III.3.1. Résultats de la recherche des anticorps antinucléaire par IFI sur cellules Hep-2

La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) a été développée par Firou (Bradwell et al., 2007). Cette méthode est toujours en pratique, cependant les hépatocytes de rat initialement utilisés comme substrat, ont été remplacés par les cellules de la lignée cellulaire humaine HEP-2 (pour Human épithélioma cells-2).

Au cours du LES, les Ac immunologiques ou les auto-Ac portent sur le dépistage et le titrage de l'ensemble des AAN sur cellules Hep-2 qui présentent une grande sensibilité dans le LES, puisque l'examen est positif dans plus de 95% des cas (Renaudineau *et al.*, 2008).

Notre étude révèle chez 100% des patients atteints de lupus systémique, des AAN positifs sur les cellules Hep-2 (**figure 15**). Ce qui est en accord avec les résultats de Renaudineau *et al.* (2008).

Pour la population des témoins sains, aucun AAN n'a été retrouvé sur Hep-2 contrairement aux témoins malades qui étaient positifs dans 60% (**figure 15**) avec un aspect moucheté à des titres majoritairement à 320. Ces résultats confirment que cet examen est peu spécifique de cette affection. En effet, ils sont retrouvés dans 30 à 70% de polyarthrite rhumatoïde, 50 à 90% des cas de sclérodémie systémique et chez 5% des témoins normaux (Youniyou, 2006).

Trois aspects principaux dominant au cours de l'IFI : homogène, moucheté et nucléolaire.

- L'aspect homogène, oriente vers des cibles insolubles : ADN, histone et nucléosome.
- L'aspect moucheté, privilégie les ribonucléoprotéines (ENA).
- L'aspect nucléolaire, témoigne d'une cible particulière ou nucléolaire.

De plus, ces aspects peuvent se superposer quand plusieurs ANA coexistent dans le même sérum. Dans notre étude, différents aspects de fluorescence ont pu être révélés chez les patients :

- 25% des patients présentent un aspect homogène (**figure17 b**) qui évoque des auto-anticorps anti-ADN, anti histone et/ou anti nucléosome.
- L'évolution de la maladie s'accompagne d'une diversification épitopique (apparition d'autres auto-anticorps, tels que les ENA), responsable du pourcentage élevé de l'aspect moucheté (**figur17 a**) obtenue par IFI et qui est de 40%.
- 10% présentent un aspect moucheté et homogène, 10% homogène et nucléolaire (**figure17 d**) et 15% moucheté et nucléolaire (**figure17 c**).

L'aspect nucléolaire retrouvé généralement dans les dermatopolymyosites et sclérodémie pourrait évoquer un chevauchement avec d'autres connectivites (Youniyou, 2006)

-Pour les aspects, homogène et moucheté, le titre est fortement positif >320 et ce pour la plupart des patients lupiques (**figure16**), ce qui nécessite l'identification et le titrage des auto-Ag nucléaires solubles (ENA) et insolubles (DNAn).

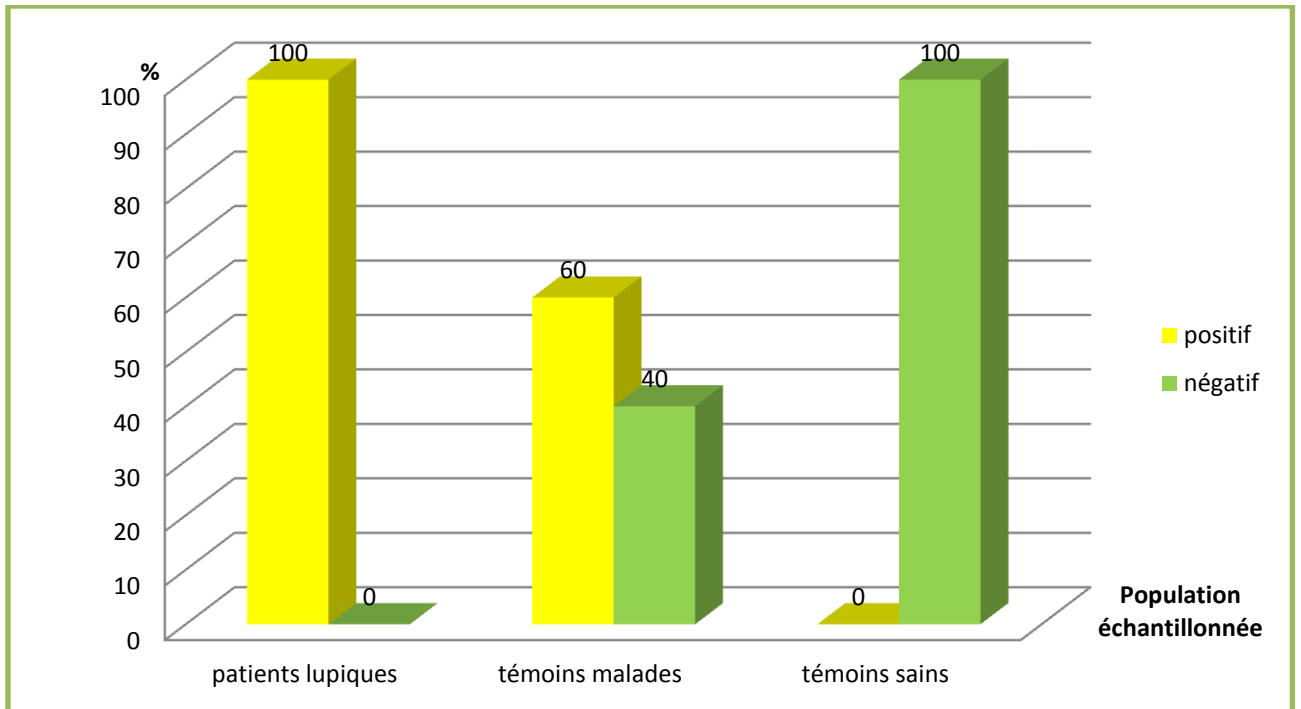


figure 15: Représentation graphique des résultats d'IFI sur cellules Hep-2 pour les patients atteints de LES et la population témoin.

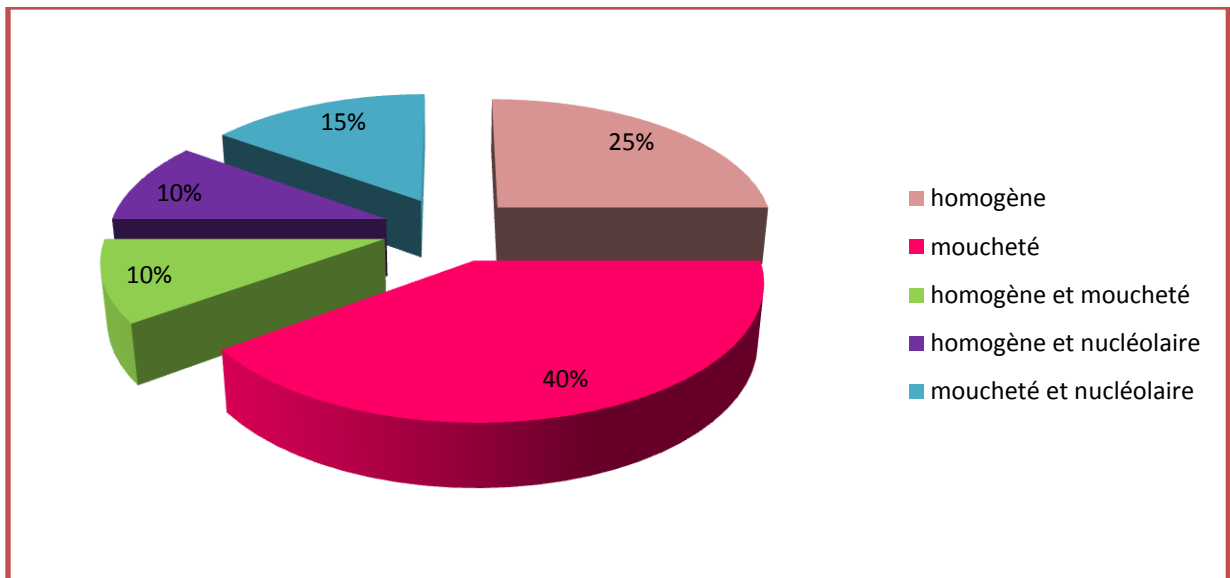


figure 16: Représentation graphique des différents aspects retrouvés chez les patients atteints de lupus systémique par IFI sur cellules Hep-2

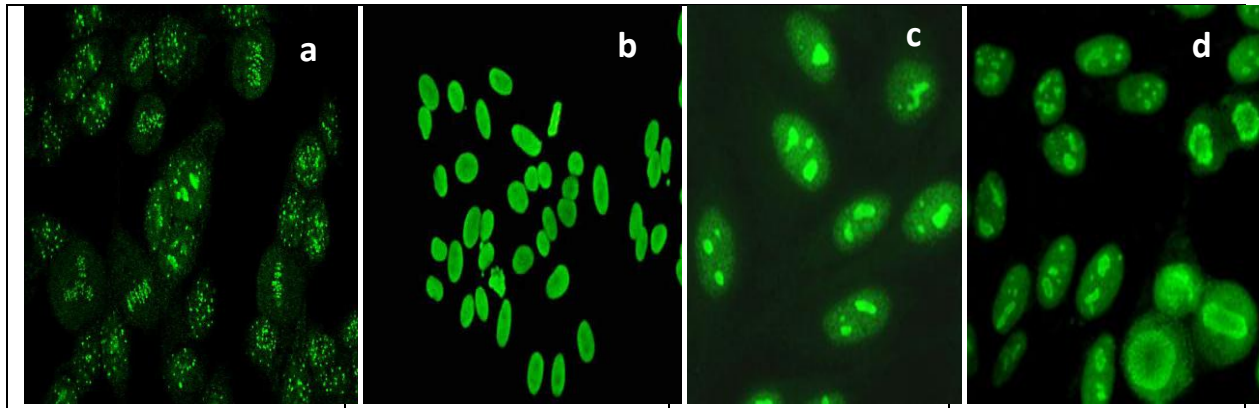


Figure 17 : les 4 aspects IFI sur cellules Hep-2, G x 400.

a : IFI sur cellules Hep2 aspect moucheté .**b**: IFI sur cellules Hep2 aspect homogène
c : IFI sur cellules Hep2 aspect nucléolaire moucheté. **d** : IFI sur cellules Hep2 aspect nucléolaire homogène.

III.3.2. Résultats de la recherche des anticorps anti-ADN natif par IFI sur *Crithidia luciliae* :

D'après nos résultats 55% des patients sont positifs pour le test IFI sur *crithidia luciliae* (**figure 20**), ils possèdent donc des Ac anti-ADNn en dépit du traitement, ce qui signifie qu'ils sont probablement en rechute. Quant aux 45% ADNn négatifs (**figure 19**), ce résultat pourrait s'expliquer par la rémission des patients grâce à l'effet du traitement qui est principalement constitué d'immunosuppresseurs et corticoïdes. Nos résultats concordent parfaitement avec ceux rapportés par Renaudineau *et al.* (2008), qui ont montré que la persistance d'un taux élevé d'Ac anti-ADNn, en dépit du traitement, majore la probabilité d'une rechute. A l'inverse, une réduction thérapeutique des Ac anti ADNn de 50% la diminue. Pour la population témoin les résultats étaient négatifs.

La recherche des Ac anti-ADNnatif par le teste d'immunofluorescence sur *Crithidia luciliae* est un examen moins sensible (50 à 80%) que l'étude des FAN mais beaucoup plus spécifique du LES, dont il constitue aujourd'hui l'élément clé du diagnostic biologique (Kallenberg *et al.*, 2006). En outre, le taux d'anticorps anti-ADN natif est bien corrélé à l'existence d'une atteinte rénale grave et à l'évolutivité du LES (Kallenberg *et al.*, 2006).

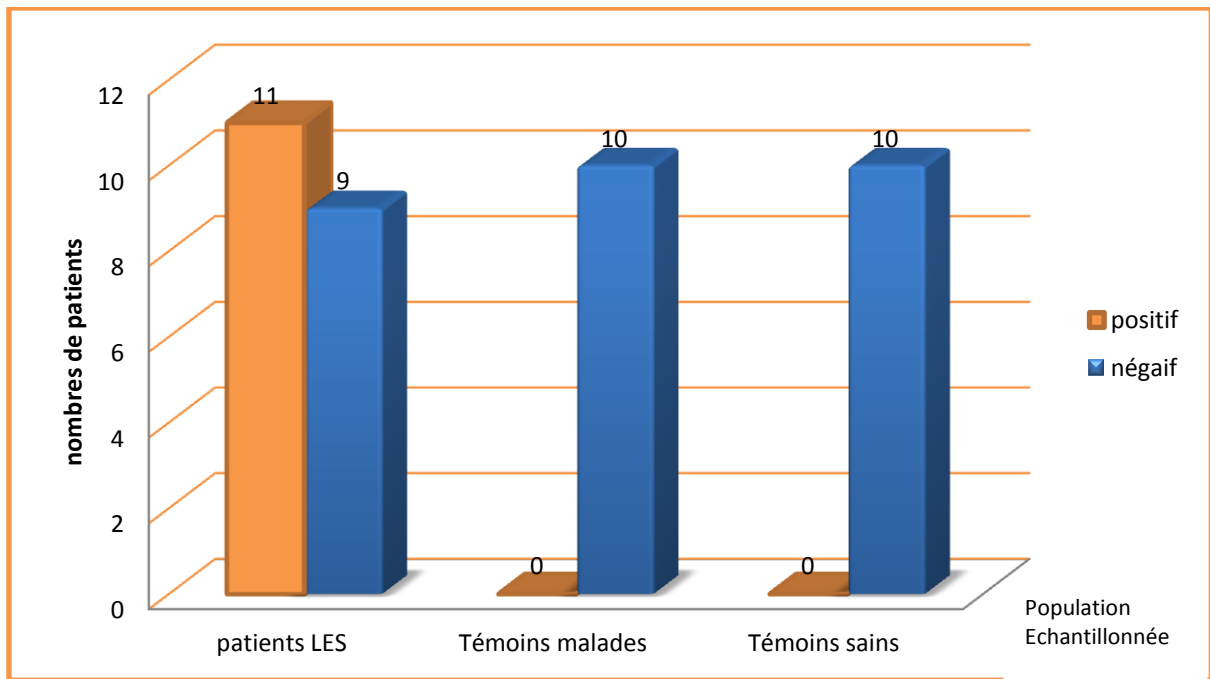


Figure 18: représentation graphique du dosage des auto-Ac anti-ADNn sur *Crithidia luciliae* chez les patients atteints de lupus.

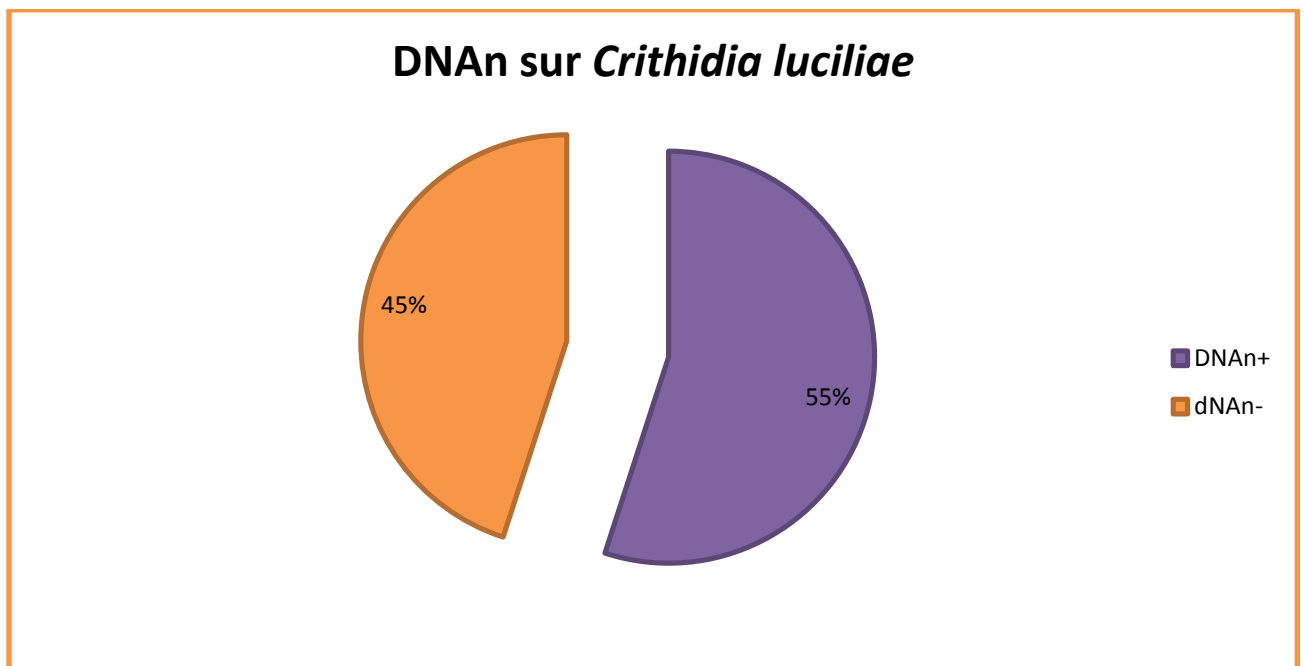


Figure 19 : représentation graphique du dosage des Ac anti-ADN natif par IFI sur *Crithidia luciliae* chez les patients atteints de lupus (DNAn+ : positif . DNAn- :négatif)

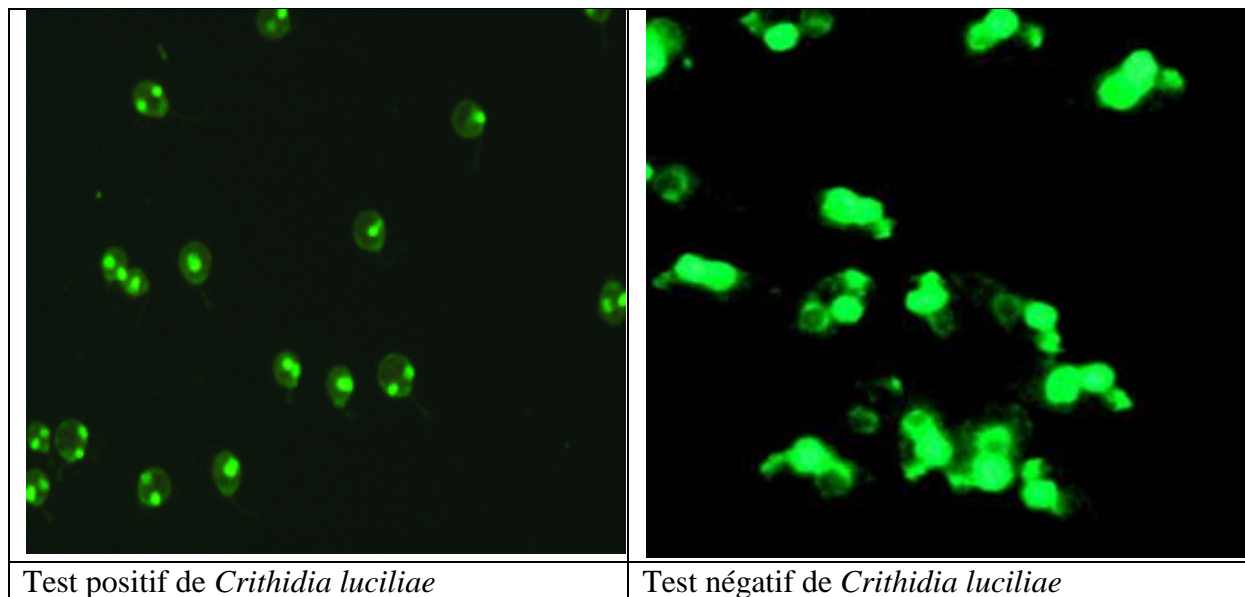


Figure 20 : résultat d'IFI sur *Crithidia luciliae* (la révélation des auto-anticorps anti-ADNn fixés au kinétoplaste)

III.3.3. Résultats du dosage des anticorps anti-ENA par Luminex

Nos résultats ont fait ressortir que (**figure 21**) :

- 43% des patients présentaient des anticorps anti-SSA. Ces derniers sont très fréquents au cours du LES, mais non spécifiques (Hirakata, 2005). Ce résultat est conforme à ce qui est rapporté par Hanly *et al.* (2007) qui a trouvé que 20% à 60% des patients lupiques possèdent ces anticorps. Un résultat similaire a été rapporté en Tunisie où une prévalence de 52% a été enregistrée dans la série étudiée par Louzir *et al.* (2003).
- 26% présentaient des Ac anti-Sm. Cette fréquence se rapproche des normes définies par l'ACR (2009), qui sont de 31%. Ils sont très spécifiques du LES (Meyer, 2010). Un taux élevé de 57% trouvé dans la série tunisienne (Louzir *et al.*, 2003). L'incidence des Ac anti-Sm au cours du LES varie d'une population humaine à l'autre ; elle est de 5% chez les européens, de 30 à 40% chez les Afro-Américains (Deligny *et al.*, 2002).
- 21% des patients sont porteurs des anti-RNP. Ce résultat est moins élevé que ce qui est rapporté dans la littérature, 30 % (Cannone, 2001), et 66% dans la série tunisienne (Louzir *et al.*, 2003). Cette différence pourrait s'expliquer par notre faible échantillon. Les anti-RNP sont détectés de façon isolée dans 95 % des cas de connectivites mixtes, et plus rarement dans les sclérodermies (15 %), la présence d'anticorps anti-RNP est associée à la présence d'une myosite et d'un phénomène de Raynaud, et généralement à une atteinte lupique moins sévère (Hanly *et al.*, 2010).
- Les anti-SSB ont été retrouvés chez 10% des patients. Ces derniers sont spécifiques au syndrome de Gougerot Sjogren (SGS) (60 à 80%)(Gottenberg *et al.*, 2005) , il est

donc permis de supposer que ces malades développeront à moyen ou à long terme un syndrome de SGS (Bujan *et al.*, 2003). Présents dans environ 15 % des cas de LES et le plus souvent associés aux anticorps anti-SS-A/Ro.

Bien que les anticorps anti-SSA et les anticorps anti-SSB sont retrouvés dans le LES, aucun des deux n'est spécifique. En effet, ils peuvent être associés à d'autres pathologies.

Pour les témoins atteints de maladies auto-immunes autres que le LES, les analyses des ENA ont données les résultats suivants :

- Un pourcentage de 23% d'anti-SSA, 39% d'anti-SSB, 15% anti-Sm et 23% anti-Sm/Rnp (**figure 22**). Ceci est en accord avec les travaux de Piette *et al.*, (2003) qui indiquent que ces ENA sont présents dans plusieurs maladies auto-immunes.

La fréquence des Ac anti-ENA varie au cours du LES. La disparité des anti-ENA rapportée dans la littérature pourrait être reliée à la sensibilité des techniques utilisées, ainsi qu'à l'origine ethnique des malades, tel que cela a été illustré par les observations de Meyer et al. (2010)

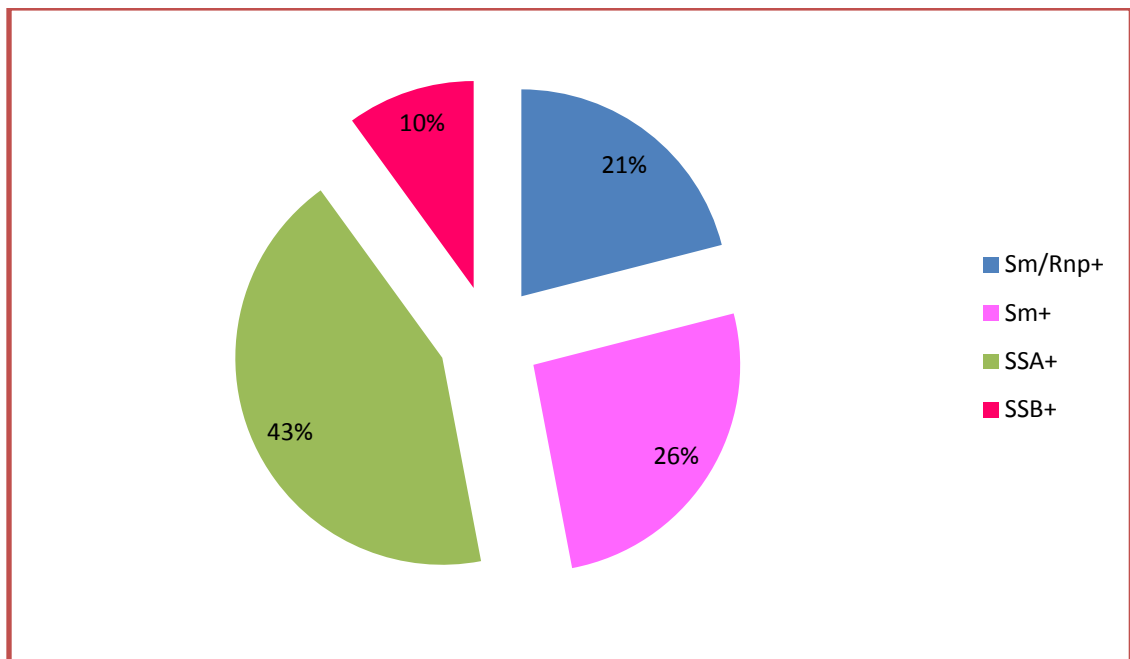


Figure 21 : représentation graphique du dosage des ENA par Luminex chez les patients atteints de lupus

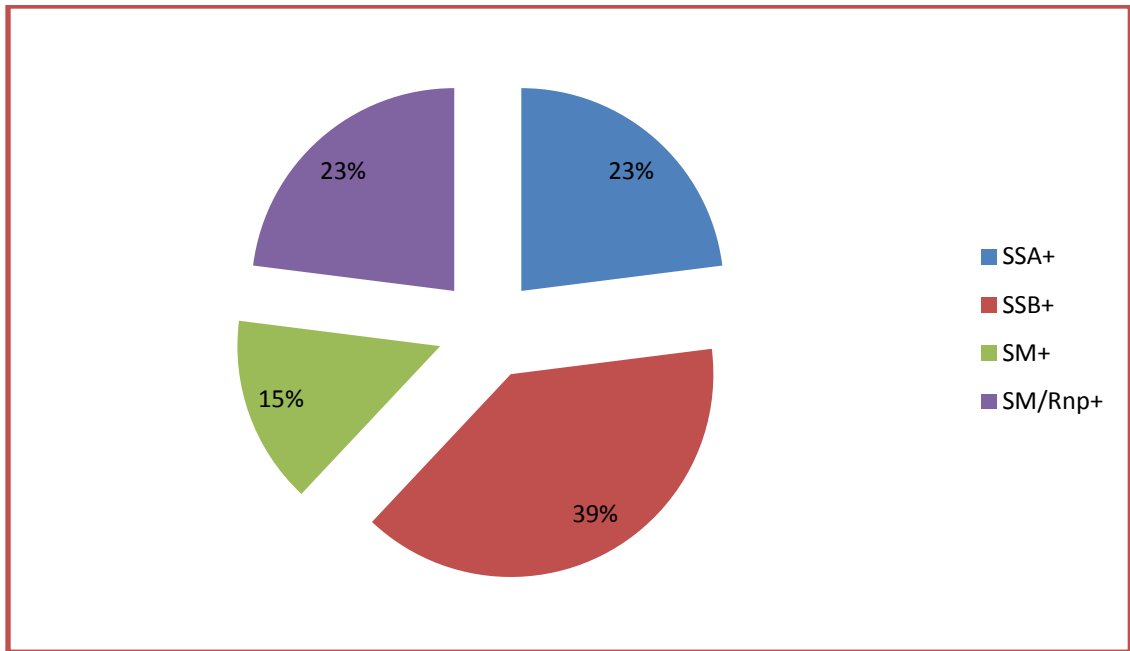


Figure 22: représentation graphique du dosage des ENA par Luminex chez les témoins atteints de maladies auto-immunes.

III.3.4. Résultat du dosage des fractions C3 et C4 par néphélométrie laser

Le résultat du dosage des fractions C3 et C4 chez les témoins sains indique des valeurs normales dans 100% des cas.

Quant aux témoins atteints de maladies auto-immunes, 30% présentent une hypercomplémentémie due probablement à l'inflammation, alors que 70% présentent des valeurs dans la norme expliqués par le suivi thérapeutique (**Figure 23**).

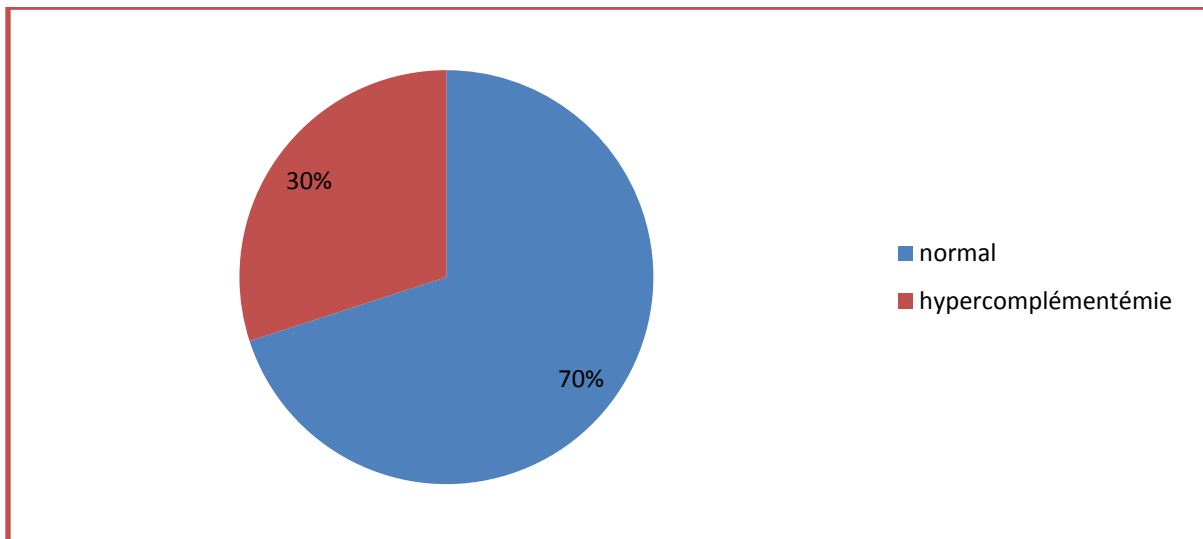


Figure23 : représentation graphique du dosage des fractions C3 et C4 du complément par néphélométrie laser chez les témoins atteints de maladies auto-immunes.

L'analyse néphélométrique des sérums de patients LES montre une hypocomplémentémie dans 75 % des cas et 25% sont en déséquilibre (**Figure 24**). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Piette *et al.* (2003).

L'hypocomplémentémie de la fraction C3 et de la fraction C4 peut résulter soit d'un déficit congénital, partiel ou complet, en un facteur du complément, soit d'une consommation par des complexes immuns ou une cryoglobuline et se traduit par une chute des fractions CH50, C3 et C4. Elle est très fréquente au cours des lupus avec atteinte rénale (Francès *et al.*, 2008), elle s'observe également chez la moitié des lupus sans atteinte rénale. En effet, un déficit génétique partiel en C4 est très fréquent chez les sujets lupiques. La conservation d'une activité C1 hémolytique contraste dans ce cas avec la consommation des fractions C2 et C4, mais le C3 n'est abaissé que si la consommation des premiers est très importante (Aitouamar *et al.*, 1999).

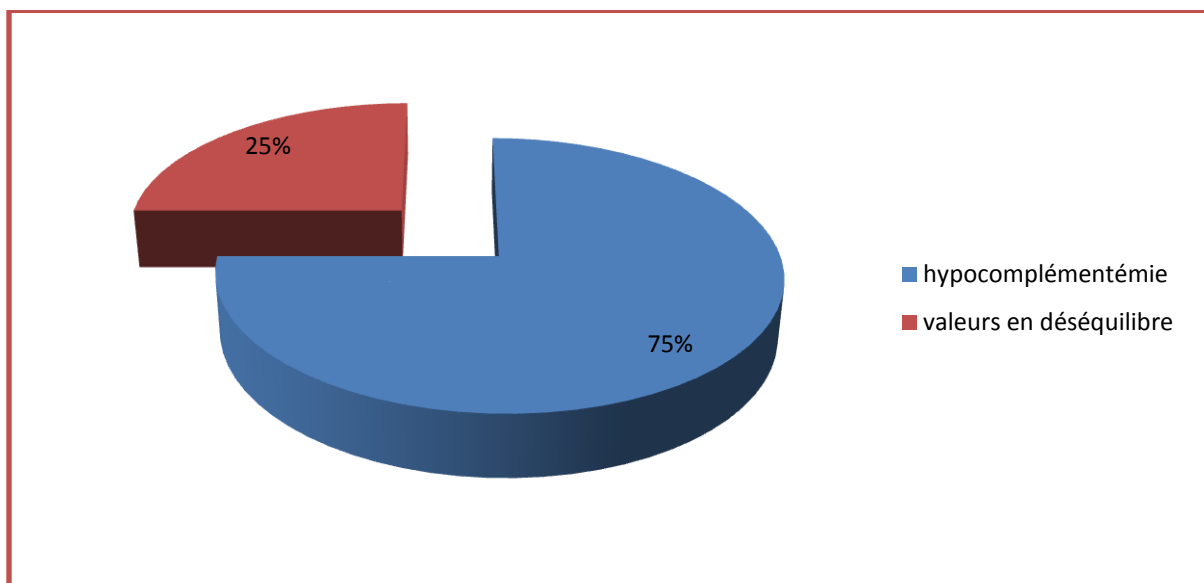


Figure 24 : représentation graphique du dosage des fractions C3 et C4 du complément chez les patients lupiques

Pour les cas où les taux des fractions du complément sont normaux, cela pourrait s'expliquer par un équilibre entre consommation et inflammation. En effet, les complexes immuns causent la consommation des fractions du complément à l'opposé de l'inflammation qui augmente le taux de fractions du complément.

III.3.5. Résultat du dosage des Anticorps anti-nucléosome par Elisa

Notre étude a révélé que 27% des patients lupiques présentaient des anticorps anti-nucléosomes (**figure 25**), alors que des études montrent que 70 à 80 % des sérums provenant de patients atteints de LES en phase active reconnaissent des épitopes de nucléosomes (Renaudineau *et al.*, 2008). Ce résultat pourrait être expliqué par notre faible effectif.

Ni les témoins négatifs, ni les témoins malades ne possèdent d'anticorps anti-nucléosomes. Ce résultat est analogue aux travaux de Pradhan *et al.* (2010).

Les anticorps anti-nucléosomes ont un effet pathogène reconnu dans la glomérulonéphrite lupique (Berden *et al.*, 2002). Les nucléosomes issus de l'apoptose tardent à être purgés par le système réticulo-histiocytaire. Grâce à leurs charges positives, les nucléosomes libres adhèrent à la membrane basale glomérulaire chargée négativement (Koutouzov *et al.*, 2004). Ces auto-anticorps apparaissent avant ceux dirigés contre l'ADN natif et les histones.

L'étude confirme une bonne sensibilité et spécificité d'Ac anti-nucléosome pour le diagnostic du LES et des expositions son association avec l'activité de la maladie et néphrite de lupus. (Budingame et Cervera, 2002)

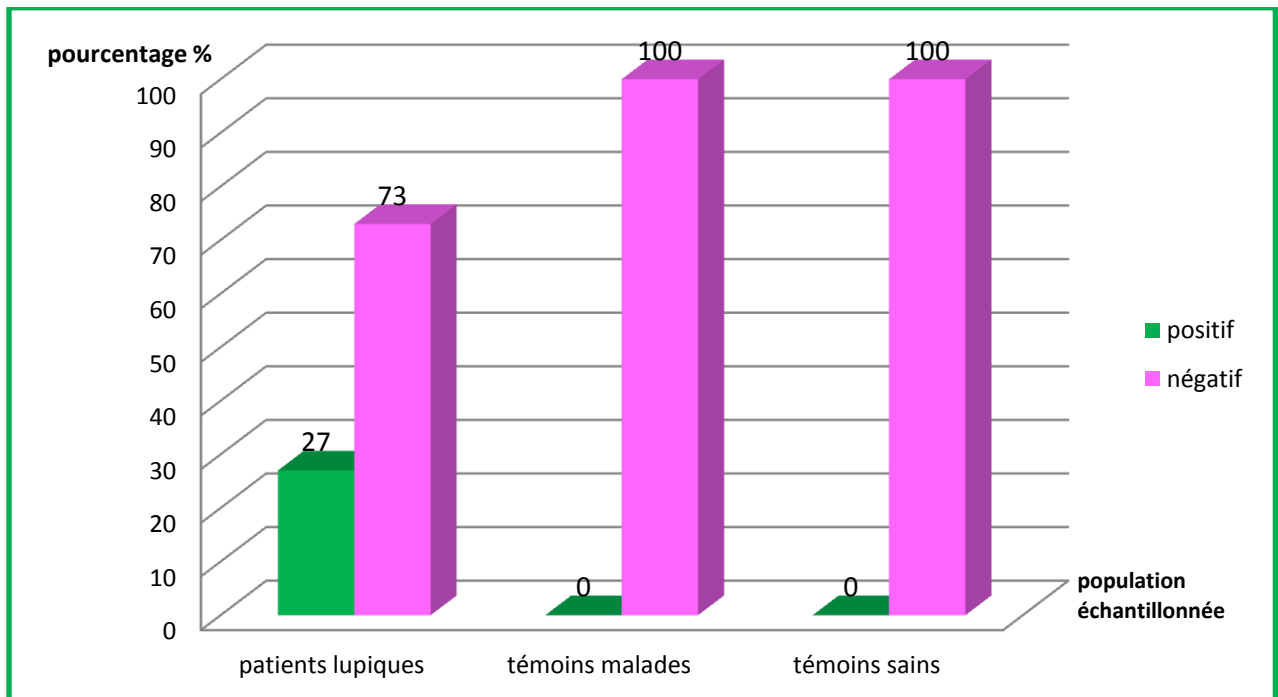


Figure 25 : représentation graphique du dosage des auto-anticorps anti nucléosomes par Elisa chez les patients lupiques, les témoins négatifs et les témoins positifs

III.3.6. Résultat du dosage des Anticorps anti-C1q par Elisa

L'étude a révélée que 37% des patients lupiques sont positifs pour le C1q (**figure 26**), ce qui est en parfait accord avec les travaux de Renaudineau *et al.* (2008). Ces derniers ont démontré que les Ac anti-C1q d'isotype IgG, apparaissent dans 10 à 30% des LES en phase active.

- Pour la population témoin, atteinte de maladies auto-immunes, 20% étaient positifs pour le C1q, ce qui pourrait annoncer une atteinte rénale ultérieure.

- Quand aux témoins négatifs, aucun d'entre eux ne présentaient d'Ac anti-C1q.

Les anticorps anti-C1q ont été largement incriminés dans la physiopathologie de la NL. En effet, d'après les travaux de Guerrier *et al.* (2007), la moitié des patients qui en possèdent souffrent d'atteinte rénale. Cependant les Ac anti-C1q ne suffisent pas à induire une NL. En effet, l'injection de ces auto-Ac à la souris ne provoque pas de glomérulopathie (Egalen *et al.*, 2011). Ils ne sont pathogènes qu'en présence d'Ac contre une cible glomérulaire comme l' α actinine, la laminine ou les nucléosomes (Amital *et al.*, 2005; Chaib-Mamouzi et Meddour, 2011).

L'augmentation du titre d'Ac anti-C1q constitue un marqueur de la rechute d'une NL (Trendelenburg *et al.*, 2006 ; Chaib-Mamouzi et Meddour, 2011)

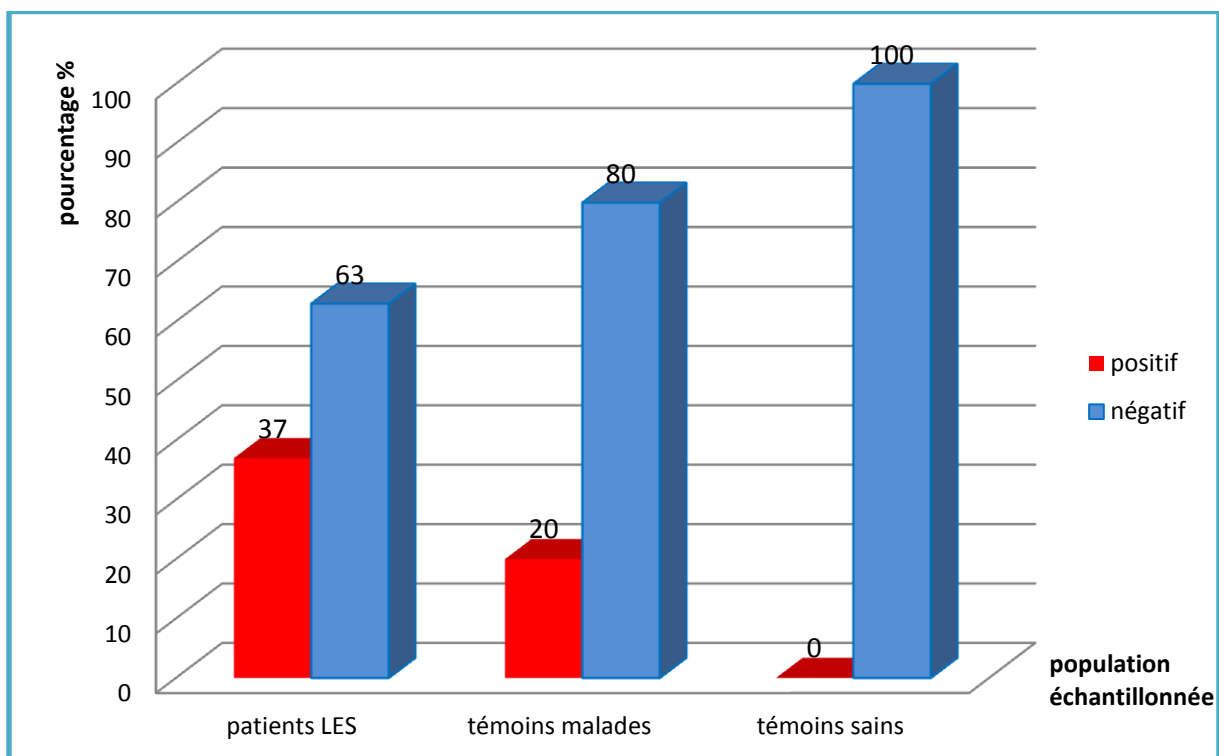


Figure 26 : représentation graphique des résultats du dosage des anticorps anti-C1q par Elisa chez les patients lupiques, les témoins positifs et négatifs.

-Dans notre étude, 33% des patients présentent une néphropathie glomérulaire (**figure 27**) Nos résultats sont en accord avec les travaux de Cachat *et al.* (2000) qui signalent que 30 à 50% des lupiques souffrent d'emblée d'une atteinte rénale. La NL est considérée comme la complication la plus fréquente et la plus grave de la maladie Lupique, puisqu'elle en constitue la deuxième cause de mortalité après les infections. Cette complication est précoce et s'installe rapidement. En effet, chez 70 à 80% des cas elle survient avant la deuxième année qui suit le diagnostic et se développe en quelques jours ou quelques semaines (Chaib Mamouzi et Meddour, 2011; Youinou *et al.*, 2008; Manson *et al.*, 2009).

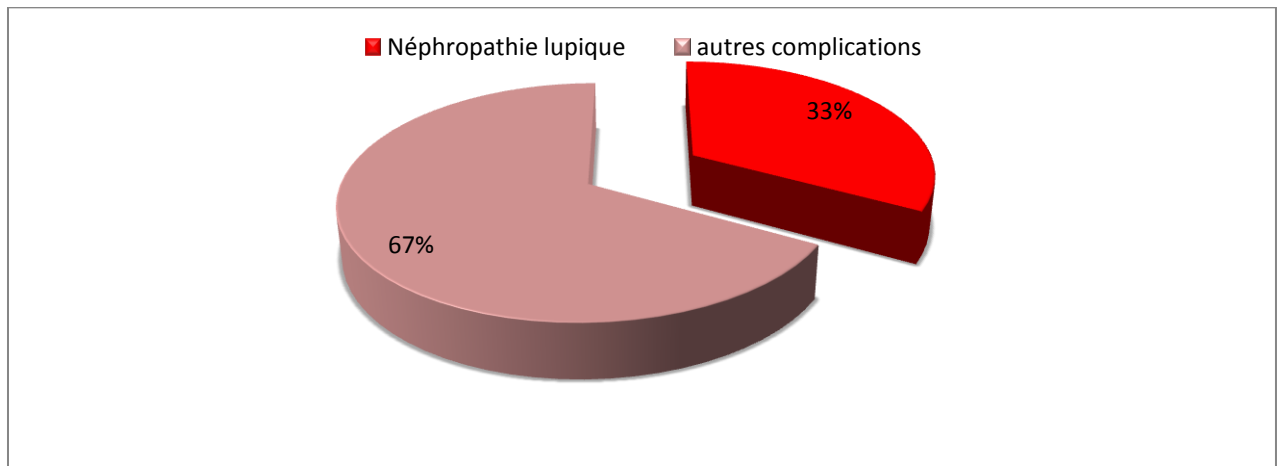


Figure 27 : représentation graphique de la complication rénale dans le LES.

III.4. relation entre les anticorps anti-ADNn et anti-nucléosomes

Les résultats des dosages concernant les anticorps anti-ADNn et les anti-nucléosomes ont révélé (**Figure 28**) :

- 5 patients possèdent des anti-ADNn et des anti-nucléosomes. Ceci pourrait être expliqué par l'évolutivité de la maladie par poussées entrecoupées de phases de rémission. (Manson *et al.*, 2009).
- 4 patients possèdent des anti-nucléosomes mais pas d'anti-ADNn. Ce résultat a un grand intérêt diagnostique lors du début de la maladie puisque les anti-nucléosomes précèdent les anti-ADNn et sont donc plus sensibles que ces derniers (Gutiérrez *et al.*, 2006).
- 9 patients présentent des anti-ADNn sans présence des anti-nucléosomes. Ce qui pourrait être dû à la diversification épitopique, puisque le nucléosome est composé essentiellement d'ADN et d'Histones. (Manson *et al.*, 2009).

L'absence des anticorps anti-ADNn n'exclue pas la présence du LES, d'où l'intérêt du dosage des anti-nucléosomes (piette *et al.*, 2002). Les anticorps anti-nucléosomes apparaissant avant ceux dirigés contre l'ADN natif et les histones.

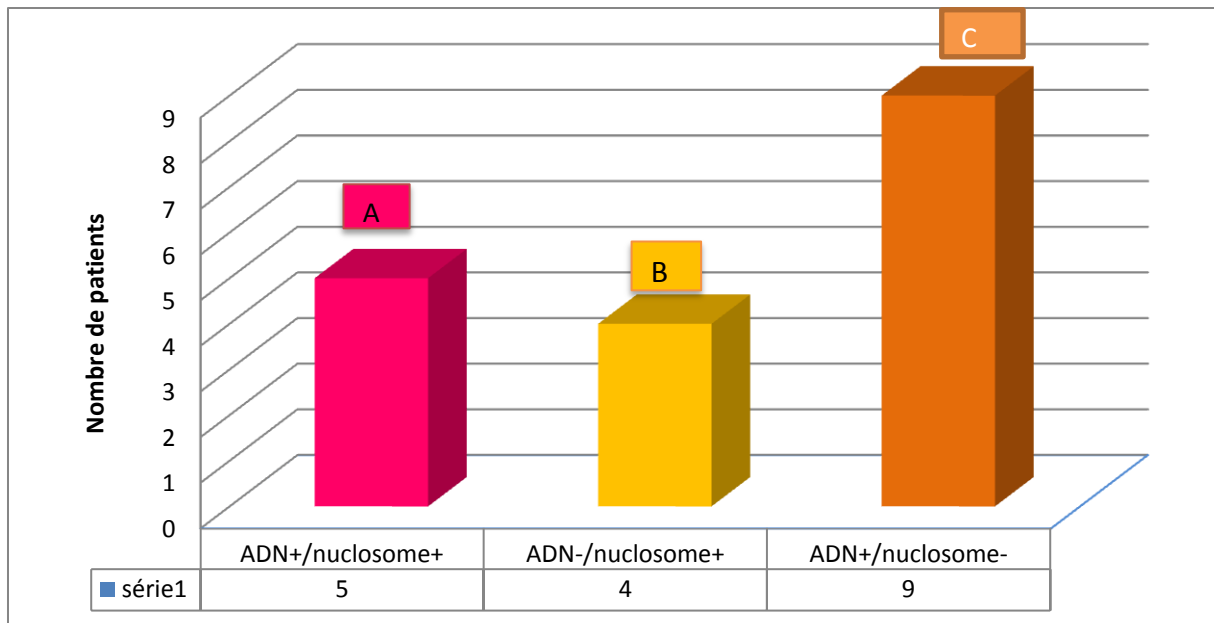


Figure 28 : représentation graphique de la relation entre les auto-anticorps anti-ADNn et anti-nucléosomes chez les patients lupiques (A : Ac anti-ADNn positif et Ac anti-nucléosome positif. B : Ac anti-ADNn négatif et Ac anti-nucléosome positif. C : Ac anti-ADNn positif et Ac anti-nucléosome négatif).

-Il existe aussi une relation entre les Ac anti-C1q et anti nucléosomes, ces auto-anticorps sont associés à l'activité de la néphropathie lupique qui évolue par poussées entrecoupées de phases de rémissions. Ces derniers sont très spécifiques au LES et ont un réel intérêt pour signaler toute rechute de la maladie et éventuellement pour renseigner de l'efficacité du traitement. (Chaib-Mamouzi et Meddour, 2011).

Conclusion

Notre étude est une contribution à la recherche de marqueurs biologiques fiables en vue d'améliorer le diagnostic et le suivi du LES. En effet, afin d'éviter un diagnostic par des méthodes invasives telles que la biopsie rénale, de nouvelles perspectives plus spécifiques, comme le dosage sérique des auto-anticorps anti DNAn, anti-nucléosome et anti-C1q semblent être une meilleure alternative.

L'étude nous a permis d'établir :

1-une démarche diagnostic du LES :

- ✚ le profil inflammatoire.
- ✚ auto-anticorps associés au LES : FAN/ DNA/ ENA.

2- un suivi du LES :

- ✚ anti-nucléosome/ anti-C1q.

3 – une association du LES avec d'autres pathologies :

autres marqueurs

Au regard de nos résultats, il apparaît que :

Le Lupus Erythémateux systémique est une pathologie très polymorphe, qui touche les hommes et essentiellement les femmes, d'une tranche d'âge comprise entre 15 et 40 ans, dont le pronostic est dominé par les atteintes rénales.

Il en ressort en premier lieu que les anticorps anti-DNAn sont les plus spécifiques au lupus érythémateux systémique et leurs présences précèdent l'apparition d'une poussée de la maladie.

L'identification des nucléosomes en tant que cible essentielle de la réponse immune et de la production d'auto-anticorps au cours du LES a ouvert un nouveau champ pour la compréhension de la physiopathologie de cette maladie et débouchera peut-être sur de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Les anticorps anti-C1q sont retrouvés fréquemment lors du LES sévère, particulièrement au cours de la néphrite lupique (l'absence d'anticorps anti-C1q permet quasiment d'éliminer une atteinte rénale actuelle ou à terme).

D'autres études portant sur un plus grand échantillon sont nécessaires pour confirmer l'implication de ces auto-anticorps. Il apparaît donc que ces auto-anticorps vont prendre une part croissante dans le diagnostic et le suivi du lupus. Même si des études complémentaires sont nécessaires, ils ont dès à présent un réel intérêt en pratique médicale. Ils doivent être recherchés en cas de suspicion clinique de LES.

Sur le plan évolutif, il est possible d'isoler deux types de formes cliniques de pronostic différent : les formes bénignes, cutanées ou articulaires, et les formes graves du fait d'une atteinte irréversible ou incontrôlable d'un organe vital.

Référence bibliographiques

- Agouti, I., Badens, C., Khattab, M., Abouyoub, A., Sayah, F., Levy, N., Bennani. 2006. Genotypic correlation between six common Moroccan mutations of beta-thalassemia and Xmn-I polymorphism **In** : Congrès International de Biochimie et Biologie Moléculaire, Agadir
- Aitouamar AB, Chkirate F, Jabourik A, Rouichi A, Bentahila A, Belhaj M., 1999. Les déficits en protéines du complément en pathologie. *Medecine du Maghreb* N°78.
- Amital H, Heilweil M, Ulmanky R, Szafer F, Bar-tana R, Moral L., 2005. Treatment with a laminine-derived peptide suppresses lupus nephritis, *J-Immunol* ; 175, 5516-23.
- Asherson R.A, Cervera R, de Groot PG, Erkan D, Boffa MC, Piette JC., 2003. Catastrophic antiphospholipid syndrome: international consensus statement on classification criteria and treatment guidelines. *Lupus.*;12:530-4.
- Berden J.H, Grootscholten C, Jurgen WC, Van der vlag J., 2002. Lupus nephritis: a nucleosome waste disposal defect. *J Nephrol*; 15:S1-10
- Beyne-Rauzy O., 2009. Anémie inflammatoire : physiopathologie et prise en charge. *La Revue de médecine interne* 30S S311–S314.
- Blanco P., Palucka K., Pascual V., Banchereau J., 2008. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor rev*;19:41-52.
- Bosly A., 2006. Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes. *Réanimation* Vol 15 - N° 4 – août ;p 243-327.
- Bradwell A.R, RG.Hughes, B,S Dphil., 2007. atlas of Hep2 patterns. Vol 14- N°3-115-120.
- Bryder D, Ramsfjell V, Dybedal I., 2001. Self-renewal of multipotent long-term repopulating hematopoietic stem cells is negatively regulated by Fas and tumor necrosis factor receptor activation. *J Exp Med*;194:941–52.
- Budingame R., Cervera R., 2002. Anti-chromatin (antinucleosome) autoantibodies, *Autoimmun. Rev.* 1 321-328.
- Bujan S, Ordi-Ros J, Paredes J, Maruti M, Matas L, Cortes J, Vilardell., 2003 Contribution of the initial features of systemic lupus erythematosus to the clinical evolution and survival of a cohort of mediterranean patients 62(9) : 859-865.
- Cachat M, Leimgrumber A, Spertini F., 2000. Lupus érythémateux disséminé et atteinte rénale, *revue Médicale suisse* ; 710 :54-9.

- Cannone. S., 2001. Propriétés du laboratoire d'immunologie. Thèse doctorat ; CHRU de Lille. France.
- Canoso J., and Cohen A., 1979. A review of the use, evaluations, and criticisms of the preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 22: 917-921.
- Cervera R, Khamashta A, Font J, Sebastiani G.D, Gil A, Lavilla P., 1999. The european working party of systemic lupus erythematosus. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5 year period. A multicenter prospective study of 1000 patients. *Medicine*; 78:167–75.
- Chahade WH, Sato EL, Moura JE, Costallat LTL, Andrade LEC., 2000. Systemic lupus erythematosus in Sao Paulo/Brazil: a clinical and laboratory overview. *Lupus*; 4:100–3.
- Chaib-Mamouzi S, Meddour Y., 2011. Apport de nouveaux auto-anticorps pour le diagnostic et le suivi de la néphropathie lupique. Service d'Immunologie *Hôpital Central de L'Armée: Dr Mohamed Seghir Nekkache.*
- Chapel H, Mansel H, Siraj M, Neil S., 2004. Immunologie clinique. Traduction de la quatrième édition anglaise. Pierre L. Masson.
- Chérin P.; Marie I., 2005. Les nouveaux critères diagnostiques et d'évaluation des polymyosites et dermatomyosites. *La revue de médecine interne.* 26 : 361-367.
- Contin-Bordes C., Lazaro E., Pellegrin J., Viillard J., Moreau J., Blanco P., 2009. Lupus érythémateux systémique : de la physiopathologie au traitement. *La revue de médecine interne.* 30 : 9-13.
- Croquefer S, Guéguen P, Renaudineau Y, Jousse S, Renaudineau E, Bendaoud B, Hanrotel C, Devauchelle V, Youinou P., 2006. Les anticorps anti-AND ne sont plus ce qu'ils étaient !... L'apport des nouvelles techniques de dépistage au diagnostic du lupus érythémateux disséminé. *Rev Fr Lab.* Vol 36. N°386 : 25-32.
- D'Cruz D.P, Khamashta MA, Hughes G.R ., 2007. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 369:587–96.
- Deligny C, Thomas L, Dubreuil F, Théodose C, Garsaud AM, Numéric P., 2002. Lupus systémique en Martinique : enquête épidémiologique. *Rev Med Interne*; 23 : 21-9.
- Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Turriel M, Petri M., 2005. Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 14:683-6.

- Fakhouri F, Lesarve P., 2008. Traitements actuels du lupus systémiques. *Rhumatisme* 74 : 759-764.
- Fessel W.J., 1974. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence prevalence, outcome and first symptoms: the high prevalence in black women. *Arch Intern Med*; 134:1027–35.
- Fiorentino D.F, Zlotnik A, Mosmann TR, Howaed MH, O’Garra A., 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*; 147: 3815-22.
- Francès C, Barète S, Piette JC., 2008. Dermatologic manifestations in lupus erythematosus. *Rev Med Interne*. 29:701-9.
- Francis L, Perl A., 2009. Pharmacotherapy of systemic lupus erythematosus. *Expert Opin. Pharmacother*. 10(9):1481-1494.
- Ferraro V, Mantoux F, Denis K, Lay-Macagno M.A, Ortonne J.P, Lacour J.P., 2004. Hallucinations during treatment with hydrochloroquine. *Ann Dermatol Venereol*.;131:471-3.
- Gandhi AM, Fazli U, Rodina V, Qazi Y.A., 2008. Costimulation targeting therapies in organ transplantation. *Curr opin organ Transplant*, 13 :622-6.
- Ghedira I , Landolsi H , Mankai A, Fabien N., Jeddi M., 2006. Anticorps antihistones au cours du lupus érythémateux systémique, comparaison entre trois techniques : Elisa, dot blot et immunotransfert. *Pathologie Biologie* 54 : 148–154.
- Gottenberg, J.E., Busson M., 2005. “Correlation of serum B lymphocyte stimulator and beta2 microglobulin with autoantibody secretion and systemic involvement in primary Sjogren’s syndrome.” *Ann Rheum Dis* 64(7): 1050-5
- Grossman J.M., 2009. Lupus arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 23(4): 495-506.
- Guerrier. T, Jousse S, Dueymes M, Youniou P, Renaudineau Y., 2007. Anticorps anti-alpha actinine et anti-corps anti-C1q : deux nouveaux marqueurs pour la glomérulonéphrite lupique, immuno-analyse et biologie spécialisée ; 22(3) :195-201.2
- Gutiérrez AOA., Koutouzov S, Mota RM, Das Chargas MM, Bach JF, Campos HH., 2006. Diagnostic value of anti-nucleosome antibodies in the assessment of disease activity of systemic lupus erythematosus: a perspective study comparing anti-nucleosome with anti-dsDNA antibodies. *J Rheumatol*;3: 1538-44.
- Haddouk S, Ben M, Ayed S, Baklouti J, Hachicha Z. Bahloul.,Masmoudi. H, 2005. auto-anticorps dans le lupus érythémateux systémique : profil et corrélations cliniques, *rev pathologie biologie* ; 53 :311-317.

- Hanly JG, Urowitz MB, Sanchez-Guerrero J, Bae SC, Gordon C, Wallace DJ., 2007. Systemic Lupus International Collaborating Clinics. Neuropsychiatric events at the time of diagnosis of systemic lupus erythematosus: an international inception cohort study. *Arthritis Rheum.* 56:265-73.
- Hanly JG, Urowitz MB, Su L, Bae SC, Gordon C, Wallace DJ., Et al 2010. Prospective analysis of neuropsychiatric events in an international disease inception cohort of SLE patients. *Ann Rheum Dis.* 69(3): 529-535
- Hirakata M, Suwa A, Takada T., 2007. Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase. *Arthritis Rheum;*56:1295–303
- Hochberg M.C. 1997. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40: 1725.
- Kahn, M-F, Meyer O., Peltier A., Piette J., 2000. *Maladies et syndromes systémiques*, 4^{ème} édition Flammarion _ Médecine science. P 1459
- Kallenberg C.G.M, Stegeman CA, Bootsma H, Bijil M, Limburg PC., 2006. Quantification of autoantibodies in systemic autoimmune disease: clinically useful? *Lupus;*15:397–402)
- Kokori S.I.G, Ioannidis JPA, Voulgarelis M., 2000. Autoimmune hemolytic anemia in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 108:198–204.
- Koutouzou S, Jironimou AL, Compos H, Amoura Z., 2004. Nucleosome in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Roume Dis clean north am.*30 (3): 529-558.
- Lepers S, Hachulla E, Leleux E, Hatron P.Y, Prin L, Dubucquoi S., 2002. Intérêt de la recherche des anticorps antinucléosome par technique ELISA dans le diagnostic de la maladie lupique. Étude comparative de quatre coffrets commerciaux. *Pathologie biologie ; Vol 50. N°10 : 584-590.*
- Louzir B, Othmani S, Ben Abdellahafidh N., 2003. Groupe d'étude du lupus érythémateux systémique en Tunisie. Etude multicentrique nationale à propos de 295 observations, *Rev. Medecine interne;* 24: 768-74.
- Mallavarapu R.K, Grimsley, E.W., 2007. The history of lupus erythematosus. *South Med J.*100: 896-898.
- Manson J.J, Alexander Ma, Rogers P, Mason LJ, Berden Jo H, Vlag J V, David P D'Cruz, David A Isenberg and Anisur Rahman. 2009. "Relationship between anti-dsDNA, anti-nucléosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis reseatch & therapy;* Vol 11. N°5: R154.

- Mathian. A et Koutouzov S., 2008. Interféron alpha : une cytokine clé dans la physiologie du lupus systémique ; *rev médecine interne* ; 29(9) : 696-700.
- Metchedjin A, Diaz P., Dutriche A., Foucher P., Camus C., Bonniaud P. Camus P., 2010. Lupus médicamenteux induit : expérience d'un service de pneumologie ; *rev médecine interne* ; 31(S3) 352.
- Meyer O, Kahn MF., 2000. Lupus érythémateux systémique. In: Kahn MF, Peltier A, Meyer O, Piette JC, editors. *Maladies et syndromes systémiques*. Paris: Flammarion Médecine Sciences; p : 131–396.
- Meyer O, Kahn MF., 2001. Lupus érythémateux systémique. In «Kahn MF, Peltier A, Meyer O, Piette JC. *Maladies et syndrome systémiques*». 4^e édition. Flammarion Médecine Sciences, Paris. pp 137-48.
- Meyer O., 2005. Critères de classifications : mode d'emploi pour le diagnostic de lupus systémique. *Revue du rhumatisme* ; 72 : 142-149.
- Meyer O., 2010. Physiopathologie du lupus érythémateux aigu systémique ; *Rev rhum* ; 77(5) :424-429.
- Mc Carty DJ., Manzi S., Medsger Jr TA., Ramsey R., Laporte RE, Kwok CK., 1995. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum*; 38:1260–70.
- Perisse D, Amoura Z, Cohen D, Saintigny P, Mekhloufi F, Mazet P, Piette JC., 2003. Case study: effectiveness of plasma exchange in an adolescent with systemic lupus erythematosus and catatonia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 42:497-9.
- Piette JC, Amoura Z, Francès C., 2003. Systemic lupus erythematosus Antiphospholipid syndrome. *Rev Prat.*;53:2175-82
- Pradhan VD, Patwardhan MM, Rojhosh K., 2010. Anti-nucleosome antibodies as a disease marker in systemic lupus erythematosus and correlation with disease activity and other autoantibodies. 76(2): 145-149.
- Rahman A, Isenberg A., 2008. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*.358: 929-939.
- Renaudineau Y., Renaudieau E., Le Meur Y., Chauveau A., Youniou P., 2008. intérêt des nouveaux examens sérologiques pour la néphropathie, *rev immunoanalyse et biologie spécialisée* ; 23(3) : 137-142
- Saint-Marcoux B., D'Brandt M., 2007. Syndrome de Gougerot Sjögren : critères de classification, lymphomes et traitements. *Revue du Rhumatisme* 74 : 737-744

- Saroux A, Joune S, Roudaut A, Devauchelle V., 2005. Epidémiologie du lupus érythémateux systémique, *rev du rhumatisme* ; 72(2) : 117-119.
- Schmit T., 2011. Les maladies auto-immunes, *Alternative médecines évolutives santé et science innovante. Intern Med* ; 1050 :193-200
- Ségalen I., Renaudineau Y., Hillion S., Harotel C., Le meur Y., Youinou P., 2011. Quel auto-anticorps pour le diagnostic et le suivie de la néphropathie lupique ?. *Rev Rhum.*
- Sibilía J., 2006. Les biothérapies immunomodulatrices : une révolution thérapeutique dans les maladies auto-immunes. 4ème colloque GEAI. Supplément au N° 384, *Revue Francophone des Laboratoires.*
- Siegle M., Lee Sl., 1973. The epidemiology of systemic lupus. *Semin Arthritis Rheum*; 3:1-54.
- Tan E.M., Cohen A.S., Fries J.F., Masi A.T., Mcshane D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J., 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25: 1271-1277.
- Tenedios F, Erkan D, Lockshin MD., 2005. Cardiac involvement in the antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 14:691-6.
- Trendelenburg M, Lopez-Trascasa M, Potlukova E, Moll S, Regenass S , Fremeaux-Bacchi V.,2006. High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsie-proven active lupus nephritis, *J Nephrol dial transplant*; 21: 3115-21.
- Viallard J-F, Taupin J-L, Ranchin V, Leng B, Pellegrin J-L, Moreau J-F., 2000. Rôle des cytokines dans la physiopathologie du lupus Vol 15 N°4, p 233-242.
- Weening JJ, D'Agati V, Schawrz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB., et al 2004. The classification of glomérulonéphritis in systemic lupus erythemateus revisited. *J Am Soc Nephrol.* 15(3) : 835-836.
- Weiss G, Goodnough LT., 2005. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*; 352:1011-23.
- Youniyou P, Renaudineau Y., 2006. Stratégie d'étude des anticorps anti-nucléaires. *Med thérapeutique* ; 12(3) :160-167.
- Youniyou P, Renaudineau Y, Saraux A., 2008. Auto-anticorps dans les maladies systémiques. In : *Traité des maladies et syndrome systémiques.* Edition Flammarion Médecine-sciences. 5^{ème} édition, sous la direction de Guillevin L, Meyer O, Sibilía J. p: 54-90.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1: Critères de l'ACR Modifiés en 1997 (*proposés par l'American College of Rheumatology (ACR) en 1982 et mis à jour par l'ACR en 1997*)

Annexe I: Critères de l'ACR modifiés en 1997

Critères diagnostiques du LES

- 1) Erythème malaire
- 2) Lupus discoïde
- 3) Photosensibilité
- 4) Ulcérations orales
- 5) Arthrite non déformante
- 6) Pleurésie ou péricardite
- 7) Protéinurie > 0,5 g/j ou > +++ ou cylindres cellulaires
- 8) Convulsions ou psychose
- 9) Atteinte hématologique :
 - a. anémie hémolytique ou
 - b. leucopénie (< 4000/mm³ à deux occasions au moins) ou
 - c. lymphopénie (< 1500/mm³ à deux occasions au moins) ou
 - d. thrombopénie (< 100 000/mm³) en l'absence de cause médicamenteuse
- 10) Anomalies immunologiques :
 - a. anticorps anti-ADN natif ou
 - b. anticorps anti-Sm ou
 - c. taux sérique élevé d'IgG ou d'IgM anticardiolipine ou test standardisé positif pour un anticoagulant circulant sérologie syphilitique dissociée (depuis au moins 6 mois)
- 11) Anticorps antinucléaires par immunofluorescence (en l'absence de médicaments inducteurs)

Le diagnostic de lupus est posé devant la présence de 4 critères présents de manière simultanée ou consécutive avec une spécificité et une sensibilité de 96%.

Critères de classification ACR 2009

Critères cliniques

1. Lupus cutané aigu ou subaigu
2. Lupus cutané chronique
3. Ulcérations muqueuses
4. Alopécie non cicatricielle
5. Synovite de ≥ 2 articulations
6. Sériete
7. Rein : prot/créat urinaire ≥ 500 mg ou cylindres hématiques
8. Système nerveux
9. Anémie hémolytique
10. Leucopénie ($< 4000/mm^3$) ou lymphopénie ($< 1000/mm^3$)
11. Thrombocytémie ($< 100000/mm^3$)

Critères immunologiques

1. ANA $>$ val référence
2. Anti-dsDNA $>$ val réf
3. Anti Sm
4. Anti-phospholipide, anticoagulant lupique, Ac anti cardiolipine, anti- β_2 GP1
5. Complément bas : C3, C4, CH50
6. Coombs direct positif en l'absence d'anémie hémolytique auto immune

LED si néphrite lupique avec ANA ou anti ds-DNA ou $\geq 4/17$ critères dont au moins 1 clinique et 1 biologique

Annexe 2 : Fiche d'exploitation

Fiche d'exploitation

Manifestations hématologiques au cours du Lupus Erythémateux Systémique

Identité :

Nom :

Prénom :

Sexe : Homme femme Age :

Origine :

Adresse actuelle :

Profession :

Mutualiste : oui non

Statut familial: célibataire marié veuf

N° d'entrée : Date d'admission :

Antécédents :

1) personnels :

Tuberculose HTA Diabète

▪ Gynéco-obstétricaux :

Ménarche :

Gestes :

Parité :

Avortements à répétition : non oui

Contraception orale : oui non

▪ Prise médicamenteuse : non oui :

▪ Autres tares :.....

2) familiaux :

ATCD de lupus : oui non non précisé

Autres maladies auto-immunes :

Motif de consultation :

- Délai de consultation :
- Mode d'admission en MI : urgences consultation
autre service :
- Manifestation révélatrice : ▪manif. Générale : non oui
- atteinte spécifique d'organe : non oui, préciser
dermatologique articulaire séreux neurologique rénale
- autres :

Clinique :

▪ TA = ▪ T° = ▪ FR = ▪ FC =

1) Signes généraux : non oui

asthénie amaigrissement fièvre

2) Manifestations hématologiques :

▪ Syndrome anémique :

▪ Pâleur : conjonctivale unguéale

▪ Manifestations fonctionnelles anoxiques :

vertiges céphalées mouches volantes

Tachycardie souffle cardiaque dyspnée asthénie autres : ...

▪ Splénomégalie : ... TDD

▪ PolyADP : superficielles profondes

▪ Signes cliniques d'hémolyse :

ictère/subictère douleurs lombaires acrosyndrome

Critères de classification du LES(ACR) :

Éruption malaire en aile de papillon

Éruption de lupus discoïde

Photosensibilité

Ulcérations orales ou nasopharyngées

Polyarthrite non érosive

Sérite : Pleurésie Péricardite

Atteinte rénale : Protéinurie persistante 0.5g/24h Cylindres urinaires

Atteinte neurologique : Comitialité Psychose

Atteinte hématologique :

Anémie :

Hb : ... Hte : ... VGM : ... CCMH : ...

Leucopénie (4000/mm³ constatée à 2 reprises) :

GB : ... PNN : ...

Lymphopénie (1500/mm³ mesurée à 2 reprises) :

Ly : ...

Thrombopénie (en l'absence de drogues cytopéniantes) :

Plaquettes : ...

Perturbations immunologiques :

Titre anormal d'Ac anti-ADN natif

Ac anti-Sm

Positivité de la recherche d'Ac antiphospholipides :

Sérologie syphilitique dissociée en 6 mois :

TPHA : ... VDRL : ...

Anticoagulant circulant de type lupique sur bilan d'hémostase :

TCA : ...

Taux sérique anormal d'Ac anti-cardiolipine

Titre anormal de facteurs antinucléaires par immunofluorescence(en l'absence de drogues inductrices).

En somme, Nombre de critères objectivés :...

Biologie :

▪ Bilan hématologique :

1) NFS :

Hb :... Hématocrite :....

VGM :..... CCMH :.....

Réticulocytes :...

Plaquettes :

Leucocytes :.... PNN :... Lymphocytes :....

2) Bilan martial : fer sérique :..... ferritinémie :.....

3) Médullogramme :.....

4) Bilan d'hémolyse :

LDH :.... Haptoglobine :..... Bilirubine libre :.....

Test de coombs direct : positif négatif non précisé

▪ Bilan de crase : TP :..... TCA :.....

▪ Syndrome inflammatoire:

VS: normale accéléré :.....

Taux de fibrinogène : normal élevé :.....

EPP : normale hyperalpha2globulinémie autre :.....

CRP : normale élevée :

Complément : baisse C3 baisse C4 CH50diminué

▪ Syndrome dysimmunitaire :

1) AAN : négatifs positifs, taux :...

IF indirecte : homogène périphérique moucheté

Anti ADN natifs : négatifs positifs, taux :...

Anti histones : négatifs positifs, taux : ...

Anti Sm : négatifs positifs, taux : ...

Anti SSa : négatifs positifs, taux : ...

Anti SSb : négatifs positifs, taux : ...

Anti RNP : négatifs positifs, taux : ...

2) Test de coombs direct : positif négatif non précisé

3) Ac antiplaquettes (test de dixon) : positif négatif non précisé

4) Ac antilymphocytes : positif négatif non précisé

5) Facteur rhumatoïde : positif négatif non précisé

6) Ac antiphospholipides : négatifs présents non précisé

Anti prothrombinases : négatifs positifs, taux :...

Anti cardiolipines : négatifs positifs, taux :...

Anti beta2 glycoprotéine : négatifs positifs, taux :...

▪ Autres bilans biologiques :

▪ Protéinurie de 24h :...

▪ Fonction rénale : Urée :... créatinémie :...

▪ Enzymes cardiaques :...

▪ Fonction hépatique :...

▪ Glycémie :...

▪ Sérologies :

Ag HBs : positif négatif

HVC : positif négatif

HIV : positif négatif

TPHA : positif négatif

VDRL : positif négatif

▪ Autres bilans :

▪ BK crachats : positif négatif

▪ ECBU : stérile IU hématies cylindres

▪ Ponction lombaire : ...

▪ Ponction pleurale : nature du liquide de ponction :

▪ Autres : ...

Imagerie :

▪ Écho rénale : normale pathologique : ...

▪ Radiographie :

Mains, note : ...

Pieds, note : ...

Autres radiographies : ...

▪ Radiographie thoracique :

Nle pleurésie pneumonie Sd interstitiel ADP médiastinales

▪ TDM thoracique : Normale pathologique, avec: ...

▪ ETT : Normale pathologique, avec: ...

▪ Échographie abdominale : ...

▪ TDM cérébrale : Normale Patho, objectivant : ...

▪ Angio IRM cérébrale : non faite Si faite, montre : ...

▪ Autres :

▪ PBR : objective néphropathie lupique stade : ...

▪ Biopsie cutanée : ...

▪ EFR : Nle patho, objectivant :

▪ Autres : ...

Attitude thérapeutique :

MHD Contraception proposée : ...

AINS Antiagrégants plaquettaires

Antipaludéens de synthèse

Corticothérapie per os avec traitement adjuvant

Bolus de MP puis relais par corticothérapie per os avec traitement adjuvant

Immunosuppresseurs en traitement initial

Autres : ...

Annexe 3 : Les réactifs :

1. IFI sur cellules Hep2 :

Antigène	Lame de substrat Hep2
Contrôle positif	Pool de sérum humain ayant une activité auto-anticorps spécifique, 1% BSA, 0.1% Azide de sodium
Contrôle négatif	Pool de sérum humain, 1% BSA, 0.1% Azide de sodium
Conjugué	Anti IgG humaines marqués à la fluorescéine
Milieu de montage	A base de glycérol
Tampon phosphate salin	Phosphate dibasique de sodium, phosphate monobasique de sodium, chlorure de sodium

2. sur Crithidia luciliae :

C1 : contrôle positif 0.5mL	Pool de sérum humain ayant une activité auto-Ac spécifique 1% de sérum-albumine d'origine bovine , 0.1% d'azide de sodium, le contrôle est fournit a la concentration de travail.
C0 : contrôle négatif 0.5mL	Pool de sérum humain, 1% de sérum-albumine d'origine bovine, 0.1% d'azide de sodium
R2 : conjugué a la fluorescéine 2.5 mL	Antisérum conjugue a la fluorescéine et dirige contre les immunoglobulines humaines, contenant 1% de sérum-albumine d'origine bovine et 0.1% d'azide de sodium
R3 : milieu de montage 2.5 mL	Un milieu de montage tampon semi-permanent, conserver dans un flacon bien ferme entre 2°C et la température ambiante
R4 : tampon phosphate salin PH de 7.3+/- 0.10, 11.34 g/flacon	Tampon phosphate salin (PBS) préparé avec du phosphate dibasique de sodium, du phosphate

	monobasique de sodium et du chlorure de sodium. Dissoudre le contenu d'un flacon dans l'eau distillé pour obtenir un volume final de 1litre
R5 : contre colorant au bleu d'Evans 2.5 mL	Colorant au bleu d'Evans, 0.1% d'azide de sodium, conserver dans un flacon bien ferme a température ambiante, stable pendant une période indéterminée

3. dosage des ENA solubles par Luminex (coffret Fidis) :

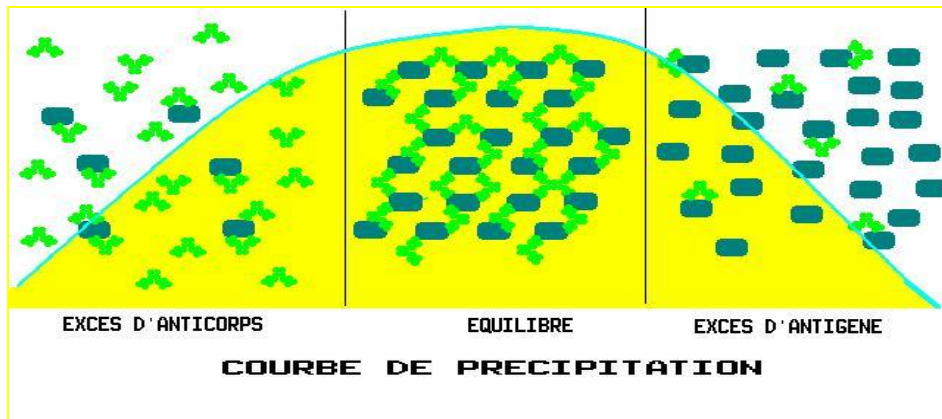
Composition du coffret fidis :

Plaque de 96 micropuits à membrane filtrante munie d'un couvercle. mp	1 plaque
Flacon (A) de 13 catégories de microsphères colorées sensibilisées par les Ag :dsDNA, SSA, SSB, TRIM21, Scl-70, Jo-1, ribosomes, CENP-B, pmSCI,PCNA et histones. Lyophilisées (à reconstituer avec le tampon D) Microsphère	qsp 6 ml
Flacon (B) tampon de dilution des échantillons (flacon blanc) DIL / SPE	2 x 115ml
Flacon de calibrateur <u>Prêt a emploi</u> : les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon CAL	1 x 1.5ml
Flacon de contrôle positif donnant une réactivité standardisée et constituant un contrôle de réaction destiné à vérifier l'activité des réactifs et le bon fonctionnement de l'essai. <u>A diluer</u> : les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon. Control +	1 x 250µl
Flacon de contrôle négatif <u>A diluer</u> Control -	1 x 250µl
Flacon de conjugué anti-IgG humaine couplé à la phycoérythrine. <u>Prêt à emploi</u> CONJ IgG	1x 12ml
Flacon (c) de tampon de lavage (flacon noir) <u>Prêt à emploi</u> BUF WASH	1 x 100ml
Flacon (d) de tampon de reconstitution des microsphères <u>Prêt à l'emploi</u> BUF microsphère	1 x 6ml

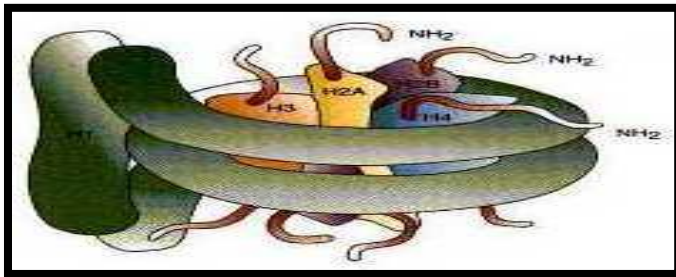
4. Réactif C3 et C4 :

Antisérums sont des sérums liquides d'origine animale, préparés par immunisation de lapins avec des fractions du complément humain C3 ou C4 hautement purifiées contiennent <0.1 % d'azide de sodium comme conservateur

La courbe de précipitation de Heidelberger : (dosage C3 et C4)



Annexe 5 : Structure du nucléosome :



➤ Annexe 6

- **Dosage C1q :**

Composants	Couleur	Format
Calibrateur 1 : 200 UR/ml (IgG humain)	Rouge sombre	2 ml
Calibrateur 2 : 20 UR /ml (IgG humain)	Rouge	2 ml
Calibrateur 3 : 2 UR/ml (IgG humain)	Rouge claire	2 ml
Contrôle positif IgG Humain	Bleu	2 ml
Contrôle négatif IgG Humain	vert	2 ml
Conjugué enzymatique : anti IgG humain (lapin) couplé à la peroxydase	Vert	12 ml
Tampon échantillon	Bleu claire	100 ml
Tampon de lavage 10 fois concentré	Incolore	100 ml
Solution du chromogène/ substrat TMB/H2O2	Incolore	12 ml
Solution d'arrêt acide sulfurique 0.5M	Incolore	12 ml

- **Dosage Ac anti-nucléosome :**

Composants	Couleur	Format
Calibrateur 1 : 200 UR/ml (IgG humain)	Rouge sombre	2 ml
Calibrateur 2 : 20 UR /ml (IgG humain)	Rouge	2 ml
Calibrateur 3 : 2 UR/ml (IgG humain)	Rouge claire	2 ml
Contrôle positif	Bleu	2 ml
Contrôle négatif	vert	2 ml
Conjugué enzymatique : anti IgG humain couplé à la peroxydase (lapin) prêt à l'emploi	Vert	12 ml
Tampon de dilution des échantillons	Bleu claire	100 ml
Tampon de lavage 10 fois concentré (10 ml tampon+	Incolore	100 ml

90ml d'eau distillé)		
Solution du chromogène/ substrat TMB/H2O2	Incolore	12 ml
Solution d'arrêt acide sulfurique 0.5M	Incolore	12 ml

• **Dosage par Elisa :**

composants	Description	Ref
Concentré de lavage	Tampon phosphate PH=7.3+/-0.2(lorsqu'il est dilué a la solution de travail) ; avec tween 20 en tant que détergeant, utilisé pour laver les puits	60 ml
Diluant simple	Tampon phosphate, PH=7.3+/-0.2 avec < 0.1% azide de sodium en tant que conservateur ; utilisé pour dilué le sérum du patient, le calibrateur et le contrôle négatif	2* 30 ml
Conjugué	Anti IgG humain couplé à la pyroxydase avec tampon PH=6.2/6.7	15 ml
ANA 6 calibrateur	Sérum humain avec ANA -6 Ac utilisé pour calculer sample's enzyme units (Eus)	0.45 ml
Contrôle négatif	Sérum humain négatif pour ANA -6 Ac	0.45 ml
Substrat	Tetramethylbenzidine (TMB) dilué dans un tampon peroxyde d'hydrogène	15 ml
Solution stop	Contient acide sulfurique 1.5% de l'acide hydrochlorique 1.5%, PH<3.0 utilisé pour stopper le développement de la coloration	15 ml

Annexe 7: Principaux médicaments inducteurs de Lupus

Dci	non commercial
Hydralazine	non commercialisé
Procaïnamide	non commercialisé
Acébutol	Sectral®
D-pénicillamine	Trovobol®
Quinidine	Longacor® Cardioquine®
Isoniazide	Rimifon®
Chlorpromazine	Largactil®
Sulfasalazine et mésalazine	Salazopyrine® et Pentasa®
Carbamazépine	Tégrétol®
Ethosuximide	Zarontin®
Triméthadione	Triméthadione®
Minocycline	Minocyne®
Interféron alfa	Roféron®
Etanercept	Enbrel®
Infliximab	Rémicade®
Hydrochlorothiazide	Esidrex®
Ticlopidine	Ticlid®
Phénytoïne	Dilantin®
Valpromide	Dépamide
Lamotrigine	Lamictal®
Acide valproïque	Valproate de sodium®

Annexe 8 : Scores pondérés des critères préliminaires du lupus érythémateux systémique

Critère	Score pondéré
Cytopénie	1,5
Erythème malaire	1,0

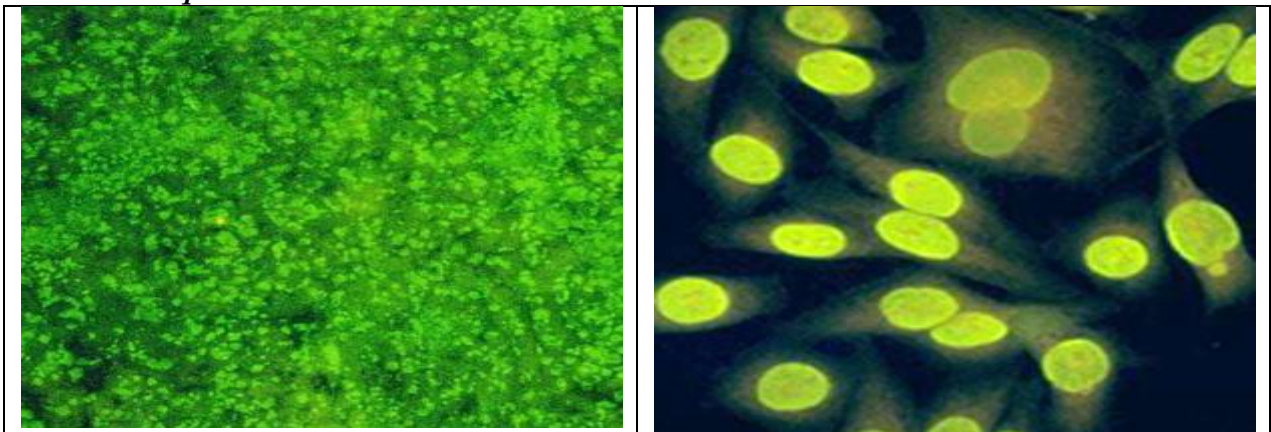
Sérite	0,6
Alopécie	0,6
Photosensibilité	0,6
Protéinurie > 3,5 g/24h	1,0
Cylindres cellulaires	1,5
Psychose ou convulsions	0,7
Lupus discoïde	1,5
Phénomène de Raynaud	0,3
Sérologie cardiolipide positive	0,5
Arthrite	0,1
Ulcérations nasales ou orales	0,1
Biologie FAN +	0,5
FAN + anti-ADN -, anti-Sm -	0,3
FAN + anti-ADN +, anti-Sm -	1,3
FAN + anti-ADN -, anti-Sm +	1,3
FAN + anti-ADN +, anti-Sm +	1,4
FAN -	-1,8

FAN -: absence de facteurs antinucléaires; FAN + : présence de facteurs antinucléaires.

Le diagnostic de lupus est posé quand le score cumulé est > 2, avec une sensibilité de 92% et une spécificité de 96%

Annexe 9 : Immunofluorescence indirecte :

Deux techniques sont utilisées




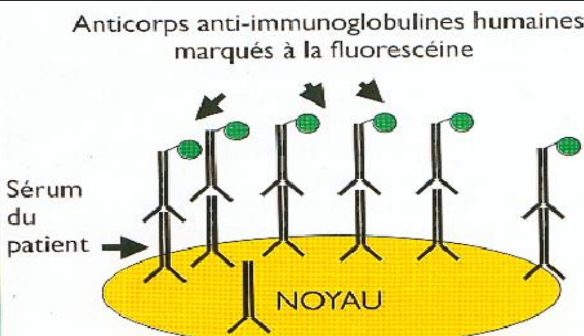
immunofluorescence indirecte sur foie (ici de rat)
Méthode globale de dépistage très sensible (95 %),
aujourd'hui rendue désuète devant son manque de spécificité et la généralisation des cultures cellulaires.

Immunofluorescence sur culture cellulaire, méthode de référence actuellement.

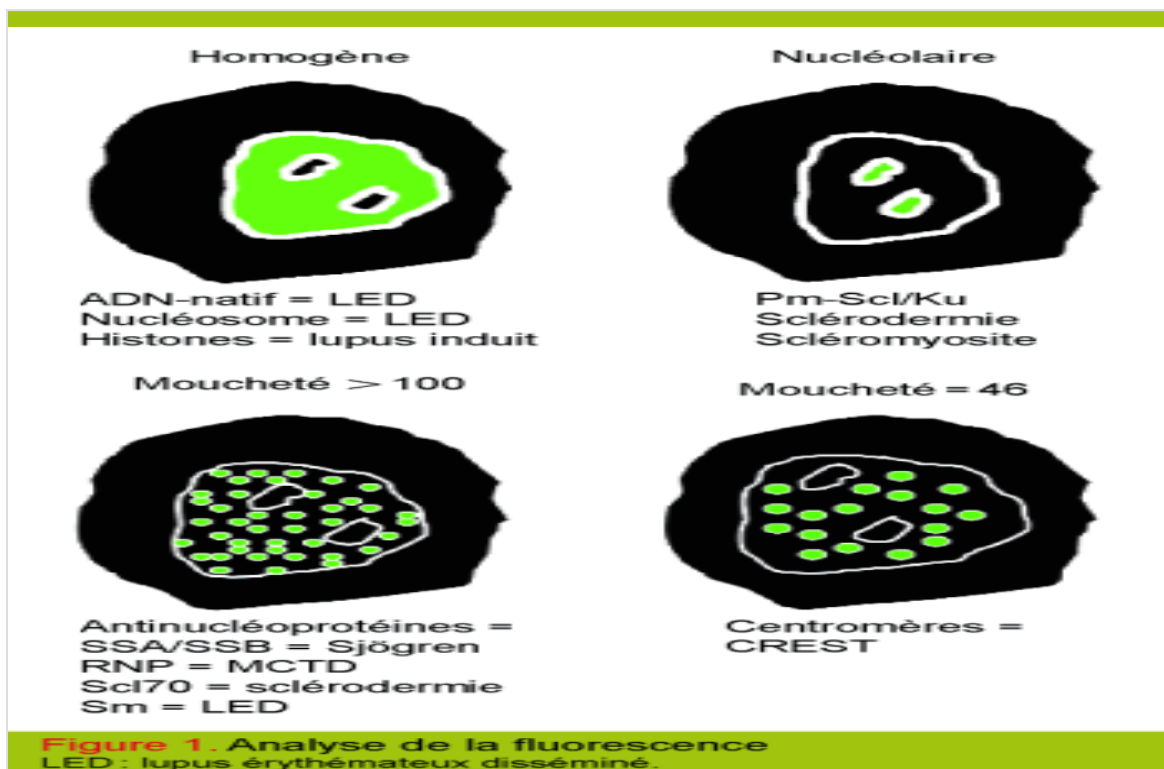
Les cellules Hep2, issues de la culture de cellules tumorales d'origine humaine (carcinome laryngé), ont pour avantage :

de posséder des noyaux proéminents, rendant plus aisée la détection et l'analyse des anticorps antinucléaires

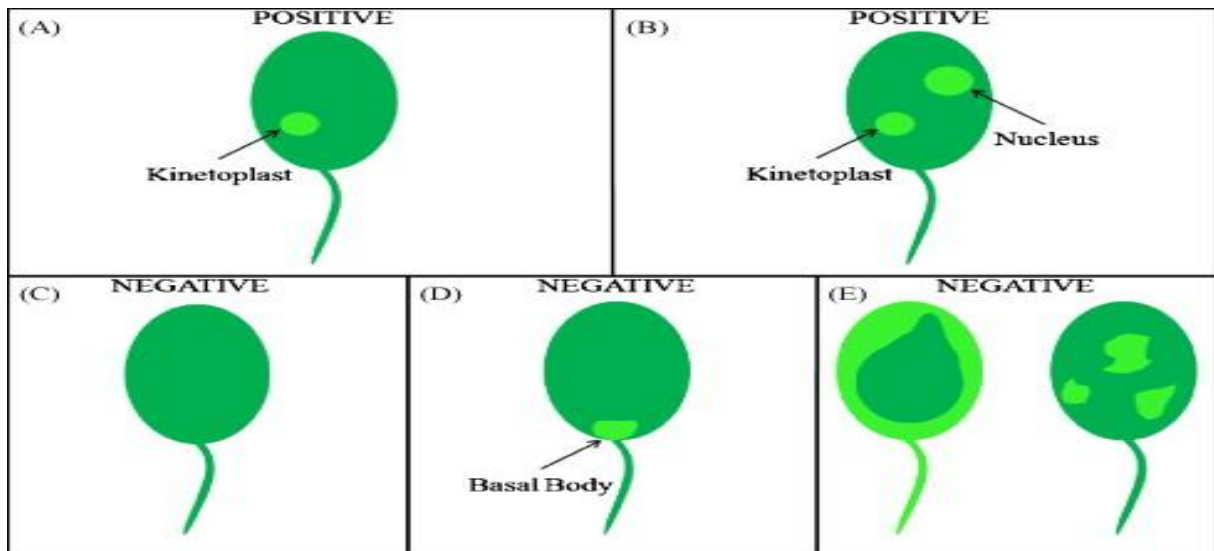
de permettre, grâce à la présence de nombreuses cellules en cours de division, la mise en évidence des auto-anticorps dirigés contre des structures mitotiques

	
<p>Lame Hep-2 (le substrat : cellules épithéliales humaines (Hep-2) immunofluorescence des anticorps (100 x 12 puits)</p>	<p>Principe de l'IFI sur cellule Hep-2</p>

(Bradwell *et al.*, 2007)



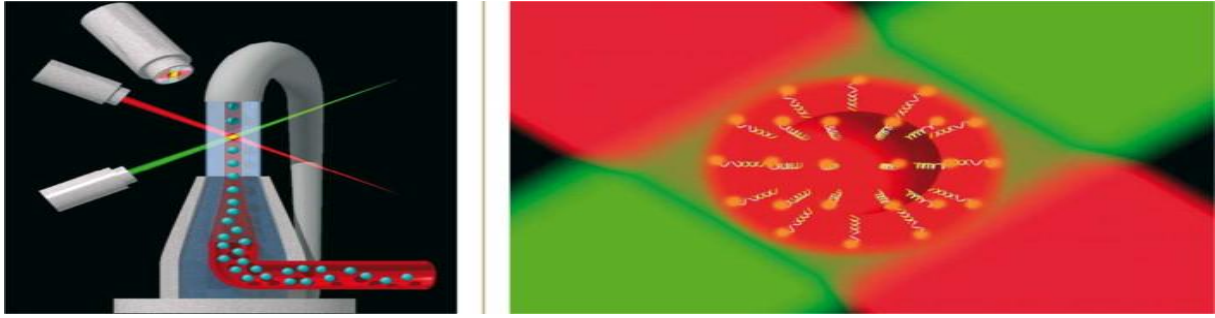
IFI par *Crithidia luciliae* : la fluorescence



(Bradwell *et al.*, 2007)

Annexe 10 : Technique luminex

<p>1) Le système Luminex®. A : fluorimètre (Luminex 100™). B : passeur d'échantillons (Luminex XYP™). C : pilote informatique</p>	<p>2) Codage fluorescent des billes dans le système Luminex®. La combinaison de 10 niveaux de concentration d'un fluorochrome orange et d'un fluorochrome rouge permet d'obtenir 100 types de billes.</p>



3) Analyses des billes dans le fluorimètre en flux. Chaque bille passe simultanément dans le faisceau des deux lasers. Le laser rouge identifie la bille (donc l'auto-antigène) par sa fluorescence intrinsèque, et le laser vert mesure la quantité de conjugué (donc l'auto-anticorps) fixé à sa surface

Néphélémétrie laser :



BN

Revue Francophone des Laboratoires
Volume 2008, Issue 404, Part 1, August
2008, Pages 59–66

Physiopathologie du LES : La diversification épitopique

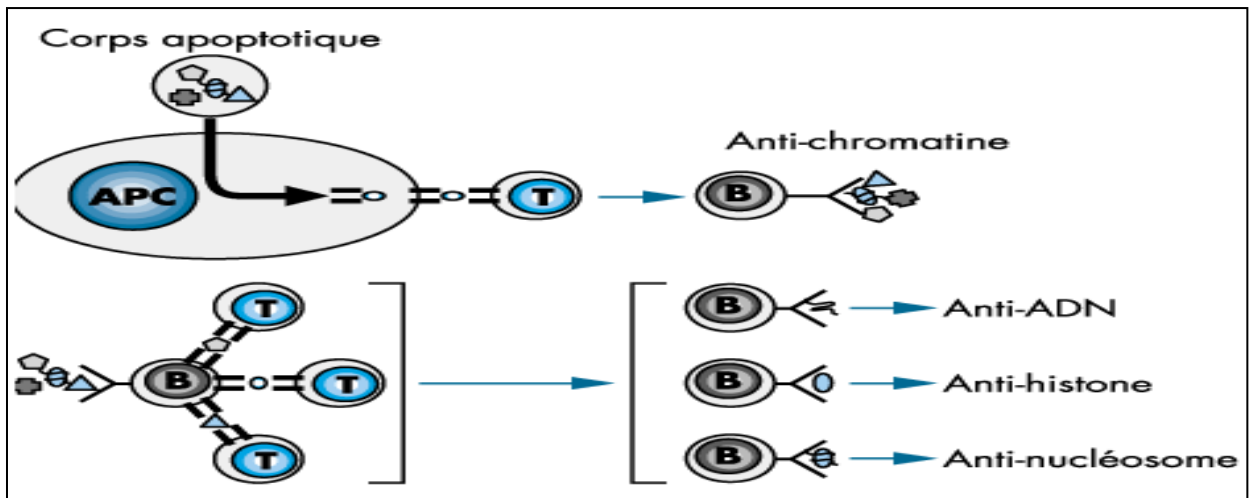


Figure 1 : Mécanismes hypothétiques de l'induction des anticorps antinucléosome.

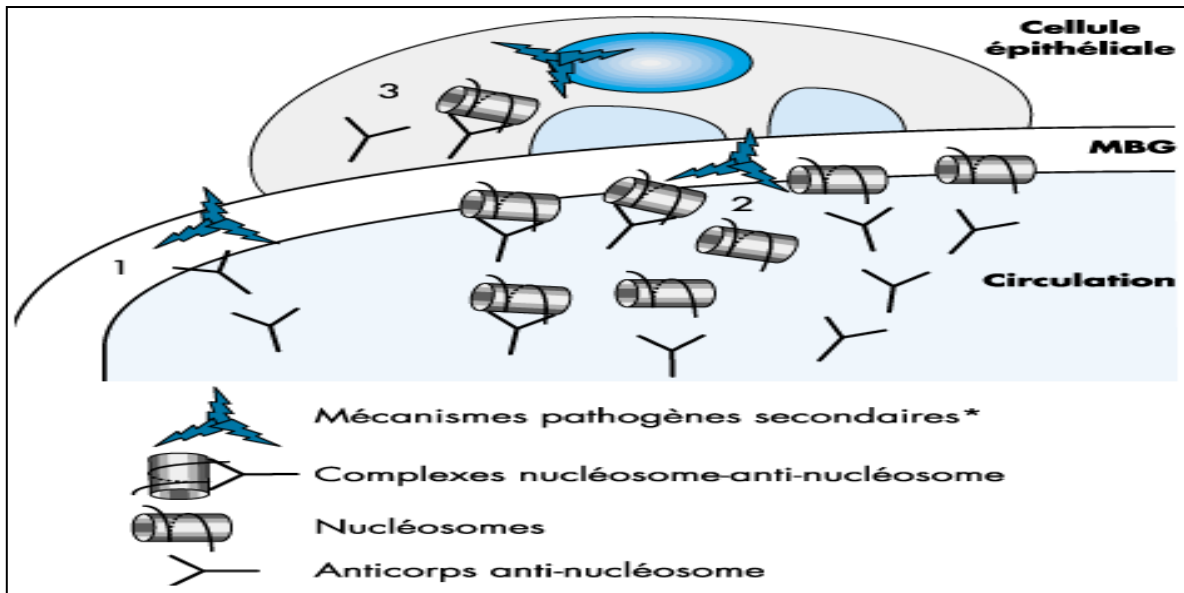


Figure 2 : Rôles pathogènes potentiels des auto-anticorps au niveau des glomérules rénaux.

MBG : membrane basale glomérulaire.

1. Mécanisme pathogène direct par fixation sur une structure glomérulaire.

2. Formation de complexes par dépôt de complexes immuns circulants et/ou formation locale de complexes.

3. Endocytose et pénétration intracytoplasmique et/ou intranucléaire d'anticorps ou de complexes