



32-610-538-1

32-610-538-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB, BLIDA



Faculté de médecine
Département de pharmacie
6ème année Pharmacie



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DU
DOCTORAT EN PHARMACIE

Option : Immunologie

Thème :

**L'apport de l'immunofluorescence indirecte dans
l'exploration des maladies auto-immunes**

Présenté par:

BELHADEF RABEA

MORCELI NADIA

Promoteur:

Dr. BOUCHEDOUB .Y ; maitre assistant en immunologie CHU Blida

Co- promotrice:

Dr. OULD ALI. L résidante en immunologie CHU Blida.

Devant le jury composé de :

Président: Pr. MEGHLAOUI.A professeur en immunologie chef de laboratoire d'immunologie CHU Blida

Examineur: Dr BOUDJELLA .ML maitre assistant en immunologie CHU Blida

Année : 2012/2013

∞ Dedicaces ∞

À travers ce modeste travail, nous rendons un grand hommage, en signe de respect et de reconnaissance à :

Nos très chers parents, qui ont cru en nous et pour tous les sacrifices et le soutien moral qu'ils nous ont apporté durant nos études, que Dieu les protège ;

Nos très cher frères qui ont toujours été là pour nous encourager et nous aider ;

Nos très chère sœurs qui ont toujours été là pour nous soutenir et nous encourager ;

Sans oublier tous nos meilleurs amis

En un mot, à toute nos familles et nos amis qui ont contribué de près ou de loin à notre réussite.

Rabea et Nadia



∞ Remerciements ∞

A

Le bon dieu qui nous a illuminé notre chemin, nous a aidé et nous a donné le courage et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Nous voudrions remercier notre promoteur

***Dr Bouchedoub.Y** ; et la co-promotrice **Dr Ould Ali .L.** qui ont suivi de près ce travail*

*Les membres du jury le **professeur Meghlaoui . A .***

*et **Dr Boudjella.ML.***

Pour avoir accepté de prendre part à ce travail et pour tous les efforts, pour nous avoir guidé jusqu'ici.

L'équipe de laboratoire d'immunologie CHU Blida

L'équipe pédagogique de la faculté de médecine de Blida.

*Le chef de département de pharmacie : **Dr. Ghuini.A.***

qui a été notre soutien durant la formation pharmaceutique.

L'ensemble de l'équipe qui nous a accueillie au cours de nos recherches (L'équipe de bibliothèque centrale et

ainsi que Celle de la faculté de médecine) .

Sans oublier tout les amis de notre promo pour l'aide et le soutien qu'ils nous'ont apportés.

Sommaire

Introduction.....	(1)
Chapitre I : La technique de l'immunofluorescence indirecte	
I. Historique.....	(4)
II. Principe de l'immunofluorescence indirecte.....	(5)
III. Les éléments de l'immunofluorescence indirecte	(6)
III.1/Le substrat.....	(6)
III.2°Le sérum.....	(8)
III. 3°Le conjugué.....	(8)
III.4 Les fluorochromes.....	(10)
III. 5/ Système optique de détection de la fluorescence.....	(16)
IV .Procédure et exécution du test.....	(19)
V. Les applications de l'immunofluorescence.....	(28)
VI. Facteurs influents l'IFI.....	(30)
VII. Problèmes posés par l'interprétation de l'immunofluorescence.....	(32)
VII.Avantages et inconvénients de L'IFI.....	(34)
Chapitre II : L'immunofluorescence indirecte et les maladies auto-immunes.	
I/L'auto-immunité.....	(37)
II/Les maladies auto-immunes.....	(38)
II.1/Les maladies auto-immunes non spécifiques d'organe.....	(38)
II.2/ Les maladies auto-immune spécifique d'organe.....	(39)
III. Les auto-anticorps.....	(40)

IV/ L'apport de l'IFI dans l'exploration des MAI.....	(41)
IV.1/ L'apport de l'IFI dans l'exploration des M.A.I.N.S.O.....	(41)
IV.1.1/ Les autoanticorps antinucléaires.....	(41)
IV.1.1.1/ Définition.....	(41)
IV.1.1.2/ La recherche des auto-anticorps anti-nucléaires.....	(43)
IV.1.1.2.1/ Le dépistage.....	(43)
IV.1.1.2.2/ L'identification des AAN.....	(68)
IV.1.2/ Les autoanticorps anti-ADN natif.....	(75)
IV.1.2.1/ Définition.....	(75)
IV.1.2.2/ Les techniques d'identifications des anticorps anti- ADN natif.....	(76)
VI.1.2/Les anticorps anticytoplasme des PNN (ANCA).....	(81)
VI.1.2.1/Définition.....	(81)
VI.1.2.2/ Principales cibles des ANCA.....	(81)
VI.1.2.3/ La recherche des ANCA.....	(82)
VI.1.2.3.1/Techniques de dépistage.....	(83)
VI.1.2.3.2/L'identification des ANCA.....	(93)
VI.1.2.3.3/ Intérêt diagnostique des ANCA.....	(93)
IV.2/ L'apport de l'IFI dans l'exploration des M.A.I.S.O.....	(96)
IV.2.1/ Les hépatopathies auto-immunes.....	(96)
IV.2 .1.1/ les différents auto-anticorps.....	(96)
IV.2.1.1/Les méthodes de détection des auto-anticorps.....	(98)
IV.2.2/Maladies auto-immunes du tube digestif.....	(110)
IV.2.2.1/Gastrite A	(110)

IV.2.2.1.1/Définition.....	(109)
IV.2.2.1.2/ IFI et anticorps anti- cellules pariétales	(111)
IV.2.2.2/La maladie cœliaque.....	(114)
IV.2.2.2.1/ Définition.....	(114)
IV.2.2.2.2/ Les marqueurs sérologiques	(114)
IV.2.2.2.2.1/ Autoanticorps anti-endomysium.....	(115)
IV.2.2.2.2.2/ Auto-anticorps anti-réticuline.....	(117)
IV.2.2.2.2.3/ Auto-anticorps anti-gliadine.....	(118)
IV.2.2.2.2.4/ Autres	(119)
IV.2.2.2.2.1.2/ Eléments à prendre en compte dans l'interprétation des marqueurs sérologiques.....	(119)
IV.2.2.2.2.1.3/ La valeur diagnostic des aAcs dans la maladie cœliaque	(120)
IV.2.3/Maladies rénales auto-immunes Syndromes de Goodpasture.....	(123)
IV.2.3.1/Définition de SGP.....	(123)
IV.2.3.2/Diagnostic.....	(123)
IV.2.3.1.3/ IFI et auto- anticorps anti-membrane basale glomérulaire.....	(123)
IV.2.4/Les endocrinopathies auto-immunes.....	(125)
IV.2.4.1/Le diabète insulino-dépendant (DID).....	(125)
IV.2.4.1.1/Définition.....	(125)
IV.2.4.1.2/Les marqueurs humoraux.....	(125)
IV.2.4.1.3/ La recherche des anti-îlots par IFI.....	(126)
IV.2.4.2.3.1/ Maladies auto-immunes de la thyroïde	(129)
IV.2.4.2.3.1.1/ Généralités.....	(129)

IV.2.4.2.3.1.2/ Anticorps anti-thyroïde	(129)
IV.2.4.2.3.1.2.2/Techniques de détection	(13)
IV.2.4.2.3.1.2.2.1/Immunofluorescence indirecte	(130)
IV.2.4.2.3.1.2.2.2/ Autres techniques	(131)
IV.2.4.4/ Les auto-anticorps dans la maladie d'Addison.....	(130)
IV.2.4.4.1/ Définition	(130)
IV.2.4.3/ Les auto-anticorps anti-parathyroïde.....	(132)
IV.2.4.3.1/ Introduction	(132)
IV.2.4.3.2/ Les cibles des auto-anticorps anti-parathyroïde	(132)
IV.2.4.3.3/ Autoanticorps anti-parathyroïde et IFI.....	(132)
IV.2.4.4.2/ Les auto-anticorps anti-coorticosurrénale	(130)
IV .2.5/Les dermatoses bulleuses auto-immunes.....	(136)
IV .2.5.1/ Généralités.....	(136)
IV .2.5.2/ Autoanticorps associés aux dermatoses bulleuses et IFI.....	(137)
IV.2.6/Maladies du système nerveux.....	(140)
IV.2.6 .1/Les auto-anticorps.....	(141)
IV.2.6 .1.1/Les anticorps anti-neurones	(141)
IV.2.6 .2 /IFI et recherche des anticorps anti- neurones	(143)
Conclusion.....	(154)

Liste des figures

Figure 1: Principe du marquage par immunofluorescence indirecte(1).....	5
Figure 2: Spectre d'absorption et d'émission de la fluorescéine (17).....	12
Figure 3 : Fluorescéine (16).....	14
Figure 4: Rhodamine(16).....	15
Figure 5 : Phycoérythrine (16).....	15
Figure 6 : Trajet de la lumière dans un microscope en épifluorescence(19).....	19
Figure 7 : La structure de la cellule HEp 2 en interphase (43).....	45
Figure 8 : La cellule HEp-2 aux stades de division (43).....	46
Figure 9 : Aspect antinucléaire de type homogène(47).....	49
Figure 10 : L'aspect est de type homogène, anti-nucléolaire (50).....	49
Figure 11 : Aspect de la membrane nucléaire sur cellules Hep-2 (47).....	51
Figure 12: Aspect des pores nucléaires (Anti-GP210)(47).....	52
Figure 13 : Aspect anti-nucléaire de type moucheté à grains irréguliers(50).....	53
Figure 14: Aspect des auto-anticorps anti Sm et /ou anti U1- Sn RNP sur HEp- 2 (50).....	54
Figure 15 : Aspect typique des SS-A /RO sur cellules HEp-2standard (50).....	56
Figure 16 : Aspect typique des SS-A /RO sur cellules HEp-2 transfectées(Hep-2000) (50).....	57
Figure 17: Aspect des auto-anticorps anti SSB/La sur Hep 2(50).....	57
Figure 18: Aspect des anti-PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) sur cellules HEp-2 (47).....	58

Figure 19 : Aspect des auto-anticorps anti-Centromère sur cellules Hep-2(47).....	60
Figure 20 : Aspect des Dots nucléaires sur cellules Hep-2 (47).....	61
Figure 21 : Aspect homogène du nucléole associé à une fluorescence mouchetée du noyau (anti-PM/Scl, anti-Scl)(47).....	62
Figure 22 : Aspect moucheté nucléole (Anti ARNpolymérase-1)[Nucleolar speckled pattern (47).....	63
Figure 23 : Aspect moucheté du nucléole (Nucleolar clumpy) [AC anti-fibrillrine et/ou anti- U3](47).....	63
Figure 24 : Aspect des Dots nucléolaire (NOR 90)(47).....	64
Figure 25 : Aspect des auto-anticorps anti- centriole sur cellules Hep-2 pattern(47).....	65
Figure 26 : Aspect des anti-NuMA1sur cellules HEp-2 (47).....	66
Figure 27 : Aspect des anti-NuMA2 sur cellules HEp-2 (47).....	67
Figure 28 : Aspect des anti-NuMA 3 sur cellules HEp-2 (47).....	67
Figure 29 : Fluorescence linéaire rectiligne traversant la cellule des Acs anti- microfilaments (47).....	70
Figure 30 : Fluorescence des Acs dirigés contre vimentine A et desmine B sur cellules Hep-2 (47).....	71
Figure 31 : Fluorescence des Acs anti-appareille de Golgi sur cellules Hep-2(47).....	72
Figure 32 : Aspect des AAM2 sur les cellules Hep-2(47).	73
Figure 33 : Fluorescence des Acs anti-ribosome sur cellules Hep-2 (47).....	74
Figure 34 : Fluorescence cytoplasmique des aAcs anti-JO-1 (47).....	75
figure 35 : Aspect des anti-ADNn sur Crithidia luciliae (50).....	78
Figure 36 : Sérum négatif sur Crithidia luciliae (50)	78
Figure 37 : Aspects de fluorescence des PNN humains fixés par éthanol (116).....	85
Figure 38 : Fluorescence des cellules HEp-2 fixées par méthanol (116).....	86
Figure 39 : Aspects de fluorescence des PNN humains fixés par le formol (116).....	87

Figure 40 : Stratégie de détection des ANCA(94).....	89
Figure 41 : Disposition des coupes de foie ,rein et estomac (substrat dans les puits de lame de l'IFI) (20).....	99
Figure 42 : Anticorps antimuscle lisse par IFI sur estomac de rat (a) , IFI sur rein de rat (b). (117).....	101
Figure 43 : Ac anti-LKM1 par IFI sur rein de rat. Fluorescence cytoplasmique des tubules proximaux(114).....	102
Figure 44 : Ac anticytosol. IFI sur foie de rat. (114).....	104
Figure 45 : Ac anti-mitochondries 2 sur rein de rat (A), sur estomac de rat(B) (114).....	105
Figure 46 : IFI sur cellules HEp2 traitées à la colchicine ,A. Ac anti-câble d'actine. B. Ac anti-vimentine. (114).....	108
Figure 47 : Fluorescence des anticorps anti-cellules pariétales sur coupe de muqueuse gastrique de rat (120).....	111
Figure 48 : Anticorps hétérophiles sur cellules de l'estomac de rat(A), rein de rat(B), foie de rat(C) (121).....	111
Figure 49 :Anticorps antiendomysium par immunofluorescence indirecte sur œsophage de singe (x200) (140).....	115
Figure 50 : Autoanticorps anti-réticuline sur foie de rat (A) et sur rein de rat (B) (149).....	116
Figure 51 : Maladie cœliaque de l'adulte : algorithme de diagnostic (151).....	120
Figure 52 : Fixation linéaire des IgG sur les membranes basales glomérulaire sur coupe de rein de primate préalablement traitée par l'urée(155).....	122
Figure 53 : Fluorescence des auto-anticorps anti- îlots de Langherhance (ICA) sur coupe de pancréas de singe (165).....	125
Figure 54 : Marquage du-cytoplasme(anti-TPO)(161)..... ;;	128
Figure 55 : Marquage de la colloïde (anti-Tg)(161).....	128
Figure 56 : Coupe de surrénale de singe(169).....	131
Figure 57 : Coupe de surrénale de singe(169).....	132
Figure 58 A : Autoanticorps antimitochondries(187).....	134
Figure 58 B : Autoanticorps anti-parathyroïde(187).....	134

Figure 59 : Anticorps anti-membrane basale par immunofluorescence indirecte sur œsophage de singe (x200) (172).....	136
Figure 60 : Anticorps anti-substance intercellulaire par immunofluorescence indirecte sur œsophage de singe (x200) (172).....	137
Figure 61 :Antigènes reconnus par les anticorps antineuronaux à cible intracellulaire(195).....	141
Figure 62 : Aspect de immunofluorescence indirecte des Anticorps anti-Hu (195)	144
Figure 63 : Anticorps anti-Ma-2. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).....	144
Figure 64 : Anticorps anti-SOX-1 (sex determining region Y box-1). Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195)	145
Figure 65 : Anticorps anti-Yo. ; Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).....	146
Figure 66 : Anticorps anti-PCA-2 (Purkinje cell antibody) . Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe (195)	146
Figure 67 : Anticorps anti-Tr. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).....	147
Figure 68 : Anticorps anti-CV-2. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).....	147
Figure 69 : Anticorps anti-amphiphysine. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).....	148
Figure 70 : Anticorps anti-GAD (glutamate décarboxylase). Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).....	147
Figure 71 : Anticorps anti-LGI-1 (<i>leucin rich glioma inactivated protein-1</i>) . Immunofluorescence indirecte sur des préparations de cellules HEK-293	148

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux aspects de la fluorescence des auto-anticorps sur cellules HEP-2 et leurs signification clinique.....	80
Tableau II : Aspect de fluorescence des ANCA selon le type de fixateur utilisé	88
Tableau III : Place des ANCA dans les maladies inflammatoires du tube digestif.....	92
Tableau IV : Associations cliniques en fonction de la cible des ANCA	95
Tableau V : Principales cibles et techniques de détection des autoanticorps recherché dans les hépatopathies auto-immunes	99
Tableau VI : Principaux auto-anticorps des hépatopathies auto-immunes	110
Tableau VII : Méthodes de dosage et spécificité des auto-anticorps de la gastrite A.....	114
Tableau VIII : Les marqueurs sérologiques de la maladie cœliaque	122
Tableau IX : Auto-anticorps associés au diabète de type I	128
Tableau X : Spécificité des auto-anticorps dans les thyroïdites auto-immunes.....	131
Tableau XI : Spécificité des auto-anticorps dans les dermatoses bulleuses auto-immunes	14
Tableau XII : Auto-anticorps à cible intracellulaire et leur signification clinique.....	
Tableau XIII : Technique de recherche des auto-anticorps à cible membranaire.....	151.

Abréviations:

aAc : auto-anticorps.

AAE=AME: anticorps anti-endomysium.

AAN=ANA: auto-anticorps anti-nucléaires.

AAM: anticorps anti-mitochondrie.

AAM-2: anticorps anti-mitochondrie de type 2.

AAR: anticorps anti-réticuline .

Ac : anticorp.

ACIC: anticorps anti-neuronaux à cibles intracellulaires.

ACM : anticorps anti-neuronaux à cibles membranaires.

ADNdb : acide désoxyribonucléique double brin.

ADNn : acide désoxyribonucléique natif.

Ag : antigène.

ANCA : anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles.

ASCA : anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae*.

ASGPR : asialoglycoprotéin receptor.

ATG : anti-transglutaminase.

°C : degré Celsius.

c-ANCA : ANCA- cytoplasmique.

CBP : cirrhose biliaire primitif.

CL : *Crithidia luciliae*.

CSS : Syndrome de Churg Strauss.

DID : diabète insulino-dépendent.

Ds-D NA: double stranded DNA.

ENA : extractable nuclear antigen.

ELISA :enzyme linked immunosorbed assay.

FITC : isothiocyanate de fluoresceine.

GAD : glutamate decarboxylase.

GBM = MBG : membrane basale glomérulaire.

GN : glomérulonéphrite.

GPC : cellules gastric paréitale.

GS-ANCA : granulocyte spécifiques

GW : Granulomatose de Wegner.

HAI : Hépatite auto-immune.

HCV : Hépatite virale C.

HEp-2 : human epithelial cell type 2.

ICA : islets cell antibodies.

IF : immunofluorescence.

IFD: immunofluorescence directe.

IFI: immunofluorescence indirecte.

Ig : immunoglobuline.

KDa : la masse moléculaire en Kilo Dalton.

LC : liver cytosol.

LED = LES : lupus érythémateux désseminé.

LM : liver microsomal.

M : molarité.

M2 : mitochondrie.

MAI : maladie auto-immune.

M.A.I.N.S.O : maladie auto-immune non spécifique d'organe.

M.A.S.O : maladie auto-immune spécifique d'organe.

MAZ = MYC : associated Zinc protein.

MC : maladie cœliaque.

MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

MPO : myéloperoxydase.

p-ANCA : perinuclear ANCA.

PE : la phycoérythrine.

PEA : polyendocrinopathies auto-immunes.

PCA : purkinje cell antibody.

PDH : puruvate déshydrogénase.

PNN: polynucléaires neutrophiles.

PR3 : peroxydase 3.

RCH : rectocolite hémorragique chronique.

SIC : substance intracellulaire.

SGP : syndrome de good pasture.

SLA : soluble liver antigen.

SMA : smooth muscle antibody.

SNC: système nerveux centrale.

SNP: système nerveux périphérique.

SOX: sex dermining region y box.

ss-DNA : single stranded DNA.

Tg: thyroglobuline.

TPO: thyoperoxydase.

UV: ultrat-violet.

VPN: valeur prédictive positive.

VPP: valeur prédictive négative.

ZMB : zone de la membrane basale.

Introduction :

Souvent les techniques immunologiques reposent sur la mise en évidence de la réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) qui est une réaction très spécifique ou le déterminant antigénique (ou l'épitope) et le site anticorps (ou paratope) doivent posséder des structures complémentaires capables de se combiner (la force d'une liaison antigène -anticorps représente la somme des forces faibles (forces de vander waals, forces électrostatiques , liaison hydrogène et liaison hydrophobes) (1) .

Ces techniques qui sont réalisées la plus part du temps en phase solide sont basés sur la détection des réactifs marqués (antigènes ou anticorps) ; c'est les techniques d'immunomarquage (2). Le marquage peut être réalisé par une enzyme (méthode immunoenzymatique). le marqueur peut être une radio-isotope, permettant un comptage de la radioactivité à l'aide d'un spectromètre gamma .Un troisième type de marquage peut s'effectuer par des particules d'or pour les examens en microscopie électronique .La chimiluminescence représente une autre technique de marquage où l'excitation de la molécule est dû à un apport d'énergie chimique caractérisée seulement par son spectre d'émission (pas d'excitation). Enfin, le marquage peut être réalisé par un fluorochrome dont les spectres d'excitation (UV)et d'émission (visible) correspondant à des longueurs d'onde différentes (immunofluorescence ,fluorométrie) (3)

Deux méthodes analytiques sont utilisées; méthodes directes (incubation directe avec un anticorps marqué et révélation) et méthodes indirecte, de loin les plus utilisées (incubation avec un anticorps non marqué et révélation indirecte par un second anticorps marqué anti-immunoglobuline dirigé contre le premier anticorps)

Le marquage peut être augmenté et facilité par l'utilisation d'un couple «amplificateur »dont le plus usuel est le couple de «streptavidine-biotine» (voir Annexe I)

Les applications des techniques d'immunomarquage sont très largement répondues en infectiologie : marqueurs d'infection et d'infectiosité (sérologie virales ,bactériennes et parasitaire) ; en biochimie, en hormonologie et en immunologie pour le dosage des cytokines , des IgE spécifiques, des marqueurs tumoraux ,des auto-anticorps.....etc (2) ,

La demande de la recherche des auto-anticorps (marqueurs des maladies auto-immunes) s'est accrue depuis ces années .

Ces anticorps doivent être en premier temps détectés et cela nécessite une technique sensible et spécifique, puis en deuxième temps l'identification de celui-ci par d'autres techniques appropriées.

L'immunofluorescence indirecte est la technique de dépistage la plus utilisée car elle permet de détecter aisément un gros nombre d'auto-anticorps et cela avec plusieurs avantages (facilité d'exécution, sensibilité, possibilité de détecter plusieurs auto- anticorps à la fois)(4)et cela le motif qui nous a pousser de démontrer son apport dans l'exploration des maladies auto-immuns spécifiques et non spécifiques d'organes.

Chapitre /

La technique de l'immunofluorescence indirecte

I/Historique :

Les racines de l'immunofluorescence remontent à 1929 lorsque **Kendall** et **Heidelberger** utilisèrent pour la première fois des protéines marquées dans leurs travaux d'immunologie. Il s'ensuivit alors plusieurs travaux (travaux de **HOPKINS** et **WORMALL**, et de **MARRACK**) en vue de marquer des antigènes et des anticorps à l'aide de protéines colorées. Mais qui se soldèrent tous par des échecs à cause de la très faible intensité de coloration au microscope optique(5).

Dès 1936, **Albert Hewitt Coons** (1912-1978), médecin biologiste, professeur de bactériologie et d'immunologie de l'école de Harvard, cherche à colorer les anticorps pour rechercher leur cible (6).

En 1942, grâce à des anticorps marqués à la fluorescéine par ses amis chimistes, il réussit à mettre en évidence des antigènes pneumococques dans les lésions de rhumatisme articulaire aigu. Ce tour de force marque le début de sa gloire. Il interrompe ses travaux pendant la guerre et finalise la technique d'immunofluorescence au début des années 50. Cette mise au point va révolutionner le monde de la biologie médicale, en particulier celui de la sérologie et de l'auto-immunité.

En 1957, naît le dépistage des anticorps antinucléaires par immunofluorescence (7). Grâce à une lampe UV récupérée dans un avion de la seconde guerre mondiale et un Ac anti-immunoglobulines humaines marqué par de la fluorescéine dans des conditions dangereuses (utilisation de phosgène), **George Friou**, chef du service des maladies infectieuses de l'hôpital de West Haven (Connecticut), montre que le sérum des lupiques se fixe sur le noyau des cellules(8). La même année, **Anderson** décrit les Ac anti-surrénales, puis en 1961 Beck décrit les premiers aspects de fluorescence des Ac antinucléaires(9). En 1962 Taylor les Ac anti-cellules pariétales gastriques, en 1965 Walker les Ac anti-mitochondries...

Avec la mise sur le marché des microscopes à fluorescence à la fin des années 60, l'immunofluorescence s'est généralisée dans les laboratoires et de nombreux aAcs ont été découverts : aAcs anti-LKM (**Rizzetto**, 1973), îlots de Langerhans (**Bottazzo**, 1974), ANCA

(Davies, 1982 et Van der Woude, 1985), cytosol hépatique (Martini, 1989), ASCA (1998) ... (10).

II / Principe de l'immunofluorescence indirecte IFI :

L'IFI utilise les propriétés de la réaction antigène/anticorps (voir Annexe II). Un Ac possède la propriété unique, par son paratope ou site anticorps, de se combiner spécifiquement à l'épitope ou déterminant antigénique d'un antigène, que celui-ci soit exogène ou endogène.

L'IFI s'effectue en deux temps : le complexe antigène-anticorps est révélé par un Ac marqué spécifique de l'isotype du premier Ac. Lors d'une première incubation, le sérum du patient, source potentielle des anticorps, est mis au contact d'un substrat (tissus ou cellules déposés dans les puits d'une lame de microscope). Après lavage, pour éliminer les protéines fixées faiblement de manière non spécifique, une deuxième incubation est réalisée avec un antisérum spécifique des immunoglobulines humaines marqué par un fluorochrome.

La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé en épillumination (figure 1) (11).

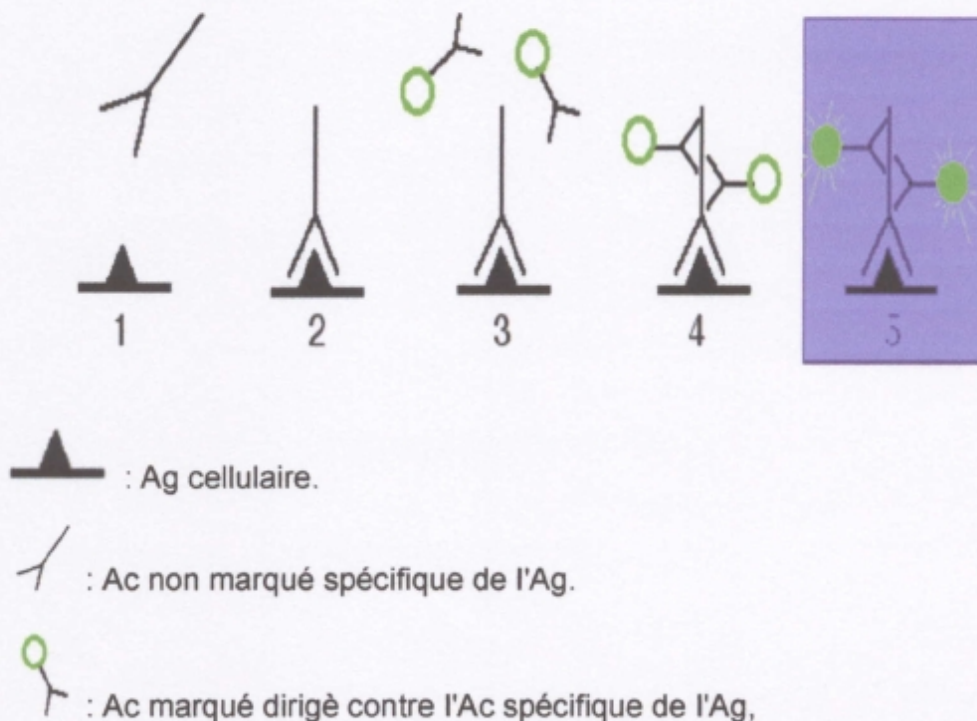


Figure 1: Principe du marquage par immunofluorescence indirecte(1)

III/ Les éléments de immunofluorescence indirecte :

III.1/ Le substrat :

Le substrat antigénique est constitué de coupes de tissus ou de cellules isolées ou en culture(12).

III.1.1/Le choix de *substrat* :

Le choix du substrat dépend du type de l'Ac que l'on veut rechercher, de la distribution et de la richesse des Ag correspondants. Ainsi, la coupe d'organe doit nécessairement contenir les structures antigéniques dont on recherche les Acs.

Les aAcs non spécifiques d'organes n'ont pas de spécificité d'espèce et peuvent être recherchés sur les différents tissus de rongeurs. Tandis que les anticorps spécifique d'organes doivent être impérativement recherchés sur des tissus de primates (12).

III.1.2/ Préparation du substrat:

La conservation de l'activité antigénique des cellules ou des tissus nécessite un certains nombre de précautions(13).

a-Matériel :

En IF différent matériaux sont utilisés :

-Frottis de micro-organismes ou des cellules : Après étalement, une bonne adhérence au verre est nécessaire pour supporter les lavages successifs. Le plus souvent, un fixateur est utilisé (voir fixateur plus loin). Il faut rappeler qu'un simple séchage par agitation manuelle énergique permet une excellente fixation. Après étalement, les antigènes sont mal déceler.

-Suspension de cellules vivantes : Pour mettre en évidence les Ags de membrane (lymphocytes par exemple), il est nécessaire d'obtenir des cellules à l'état vivant,

-Coupe d'organe : Un fragment ou une biopsie est prélevée après anesthésie de l'animal, en salle d'opération ou à l'autopsie (celle-ci doit être précoce, au maximum 2 heures après le décès). Les fragments sont transportés à +4°C et traités le plus rapidement possible. La

réalisation des coupes ou microtomes est effectuée à partir d'organes traités de la façon suivante :

- *Enrobage dans la paraffine* : de façon relativement exceptionnelle. L'organe peut être fixé dans le formol, comme pour les techniques classiques d'histologie, ou mieux fixé dans l'éthanol 95% pendant 5 à 24 heures. Après déshydratation dans l'éthanol puis sont faites au microtome. Les coupes sont «dipparafinées» par 2 bains de xylène et 3 bains d'éthanol. Peu d'antigènes résistent aux différentes étapes de la manipulation.
- *Congélation et section au cryostat* : le plus souvent l'Ag nécessite des méthodes moins drastiques. Des cubes d'organes de 0,5 à 1 Cm de côté sont constitués, associés parfois entre eux selon les besoins. Ces blocs sont rapidement congelés soit en les plongeant dans un mélange neige carbonique / éthanol ou acétone (-70°C) soit de préférence en les immergeant dans l'azote liquide (-196°C). Ces blocs se conservent seulement 2 à 3 semaines à -25°C plusieurs mois ou années à -80°C, indéfiniment à -196°C. Le cryostat est réglé vers -18°C ou à une température plus basse (-30°C pour certains tissus comme la graisse ou le cerveau). Des coupes les plus fines possibles (4 - 6 µm) sont réalisées. Elles peuvent être conservées dans des boîtes d'histologie à -80°C pendant plusieurs mois. Un séchage à la température de laboratoire pendant quelques minutes est nécessaire avant l'utilisation afin de retirer la condensation de vapeur d'eau.
- *Lyophilisation* : ce procédé excellent est moins utilisé car il est coûteux. Les fragments d'organes sont congelés puis lyophilisés à -40°C. Ceux-ci peuvent alors être enrobés dans la paraffine à -56°C puis sectionnés(13).

b-Fixateurs :

Pour les différentes préparations et à différents moments, les fixateurs sont parfois utilisés : éthanol 95%, méthanol 95%, mélange à partie égale d'éthanol et de méthanol, éther, acétone, et formaldéhyde 1 à 4%, glutaraldéhyde 0,5 à 5% dans l'éthanol absolu à -20°C, acide acétique à 5% diéthylprocarbonate , (3 heures à 55°C). Il est nécessaire de contrôler le maintien de l'activité antigénique après ce traitement(13).

III.2/le sérum :

La recherche des anticorps par l'IFI peut se faire sur tous les liquides biologiques. Cependant, le recours au sérum est la pratique la plus courante en routine, qui doit être dilué ; la dilution initiale du sérum pour le dépistage est fonction du type d'autoanticorps à rechercher. On choisira pour chaque type la dilution à partir de laquelle les titres des aAc deviennent cliniquement significatifs(13).

III. 3/Le conjugué :

L'anti-immunoglobuline fluorescente est généralement polyvalente, reconnaissant les trois sous classes d'Ig. Il est cependant nécessaire dans certains cas d'utiliser seulement un antisérum monospécifique IgG ou IgA par exemple pour éviter les fausses réactions. Avec les coupes d'organes de primates, il convient d'utiliser une antiglobuline préalablement absorbée avec des extraits d'organes(13).

Pour la conjugaison d'un Ac ou d'une antiglobuline, la méthode est bien standardisée.

III.3.1/Conjugaison proprement dite :

Pour l'isothiocyanate de fluorescéine (voire fluorochromes) la conjugaison a lieu à PH 9,5. Les immunoglobulines purifiées de l'immun-sérum, amenées à une concentration de 20 mg/ml. Sont portées à PH 9,5. Grâce à une solution de phosphate trisodique 0,1 M PH 9,5. On ajoute une quantité de fluorochrome de 20 mg pour 1 mg d'immunoglobulines, afin d'obtenir un degré moyen de conjugaison de 4 molécules pour 1 molécule d'IgG. L'ensemble est mit 3 heures à la température du laboratoire dans l'obscurité. Le PH est ramené à 7,2 pour arrêter la réaction.

Le fluorochrome libre est retiré par le procédé suivant :

-Filtration sur gel de Sephadex G25 ou G50 la taille des fluorochromes est au dessus de la limite d'exclusion de Sephadex G25. Après passage sur colonne, les protéines marquées sortent les premières alors que le fluorochrome libre n'est élué que très tardivement.

-Fractionnement sur DEAE cellulose : Le passage du sérum conjugué sur DEAE cellulose permet en outre ; grâce à des solutions salines de concentration croissantes d'éliminer d'abord les molécules faiblement marquées puis celles qui le sont plus. On peut recueillir les

protéines dont le degré de conjugaison est de 2 à 4 molécules de fluorochrome par molécule(13).

III.3.2/ Contrôle du conjugué :

a .Contrôle physique :

Le degré de conjugaison de l'immunsérum est un des caractéristiques importantes de la qualité du conjugué : une conjugaison faible entraîne la fixation d'Ac non marqués qui neutralise la fluorescence ; une conjugaison forte la fluorescence non spécifique par fixation de ces molécules devenue trop électronégatives les structures basiques des tissus. Le degré de conjugaison optimal est de 2 à 4 molécules de fluorochromes par molécule d'Ig. En fait des antiglobulines plus conjuguées peuvent se révéler très performantes.

La valeur moyenne du degré de conjugaison peut être obtenue en mesurant la concentration du colorant et celle de la protéine dans le conjugué. Le fluorochrome est dosé au spectrophotomètre par mesure de l'absorption à 430 nm pour l'isothiocyanate de fluorescéine, avec comme référence une solution connue de fluorescéine pure ou d'aminofluorescéine. Les globulines sériques sont dosées, par exemple, par la méthode du biuret. Le degré moyen de conjugaison de l'immunsérum étudié sera égal au poids des globulines et multiplié par $2,33 \cdot 10^{-3}$. Ce dernier chiffre est le rapport entre la masse moléculaire de la fluorescéine (376) et la masse moléculaire des IgG (160 000). L'hétérogénéité de la conjugaison est mise en évidence par le fractionnement chromatographique du conjugué(13).

b. Contrôle immunologique :

Les diverses méthodes immunologiques peuvent être utilisées pour contrôler l'activité anticorps des immunoglobulines conjuguées ainsi que leurs spécificités. Une antiglobuline peut être contrôlée par immunoélectrophorèse vis-à-vis d'un sérum entier. Ces premières identifications ne sont qu'une première étape nécessaire pour savoir si le conjugué a conservé une activité anticorps. En fait, un contrôle avec la méthode d'immunofluorescence permettra de vérifier la spécificité de la réaction(13).

III.4 / Les fluorochromes :

III.4.1/ Définitions:

a. La fluorescence:

C'est une forme de luminescence se produisant suite à l'absorption de photons par une molécule de type fluorophore, fluorochrome ou sonde fluorescentes. C'est un phénomène physique classe dans l'ensemble des phénomènes de luminescence comprenant la photoluminescence(PL) (fluorescence, phosphorescence) et les autres types de luminescence. La PL est un phénomène radiatif consécutif à une excitation lumineuse tandis que la chimiluminescence est un phénomène radiatif consécutif à une réaction chimique (chimiluminescence vraie) ou enzymatique (bioluminescence).

Ces différents phénomènes se distinguent essentiellement par la nature de l'énergie d'excitation impliquée(14).

b- Les fluorochromes :

Ce sont des substances qui, soumises à un rayon lumineux UV, absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde -passent à un état excité -et qui, pour revenir à l'état fondamental, émettent une lumière de longueur d'onde différente de celle absorbée (λ émise $>$ λ absorbée) (15)

Trois sont d'utilisation courante :

L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et la rhodamine

Lorsque des Ac sont marqués par un fluorochrome, les complexes immuns contenant ces Acs marqués sont détectés par l'émission de lumière colorée s'ils sont excités par une lumière de longueur d'onde adéquate.

III.4.2/ Caractéristiques des fluorochromes:

a.Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule :

Chaque molécule peut être caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres et qui reflètent la distribution de probabilités des transitions énergétiques. Ils sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules(14).

- **Spectre d'excitation :**

Il correspond à la longueur d'onde optimale permettant l'élévation d'une molécule d'un état basal à un état excité ou intermédiaire(16).

- **Spectre d'émission:**

Il correspond au rayonnement émis par le retour de l'état intermédiaire à l'état de base. Ce spectre d'émission est dévié vers les plus faibles énergies, donc vers les longueurs d'ondes plus élevée(16).

Le spectre d'absorption est caractéristique d'une molécule dans un environnement donné et le spectre d'excitation de son éventuel centre fluorescent lui est très généralement identique. Le spectre d'émission de fluorescence est approximativement une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption(14).

Une partie seulement de l'énergie absorbée peut être émise sous forme de rayonnement, moins énergétique (ainsi longueur d'onde λ du maximum d'excitation $<$ λ du maximum d'émission).

Concernant l'iso-thiocyanate de fluorescéine ou FITC, son spectre d'émission étant approximativement l'image miroir décalée vers le rouge de la bande d'absorption située vers les plus courtes longueurs d'onde.

On note que le spectre d'émission conserve sa forme indépendamment de la partie du spectre d'excitation effectivement exploitée par la source lumineuse. Par contre, l'efficacité du processus sera modifiée, et des phénomènes annexes comme la photo-destruction ou la dépendance sur pH peuvent être largement modifiés.

La distance entre les maxima d'excitation et d'émission s'appelle le **déplacement de Stokes** (ou Stokes Shift) (pour la fluorescéine, respectivement 495 nm et 521 nm, soit un Stokes Shift = 26 nm)(figure 2).

Si ce déplacement est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres. En pratique, pour pouvoir séparer efficacement, à l'aide de miroirs dichroïques, la forte lumière incidente (λ_1) de la faible fluorescence émise (λ_2), ce déplacement doit être >20 nm.

L'effet « miroir » entre spectres d'excitation et d'émission n'est pas toujours observé : des dissimilitudes entre les deux spectres peuvent révéler l'existence de plusieurs formes de la molécule considérée, caractérisées par des longueurs d'onde d'absorption et/ou d'émission différentes (cas de la chlorophylle) (17)

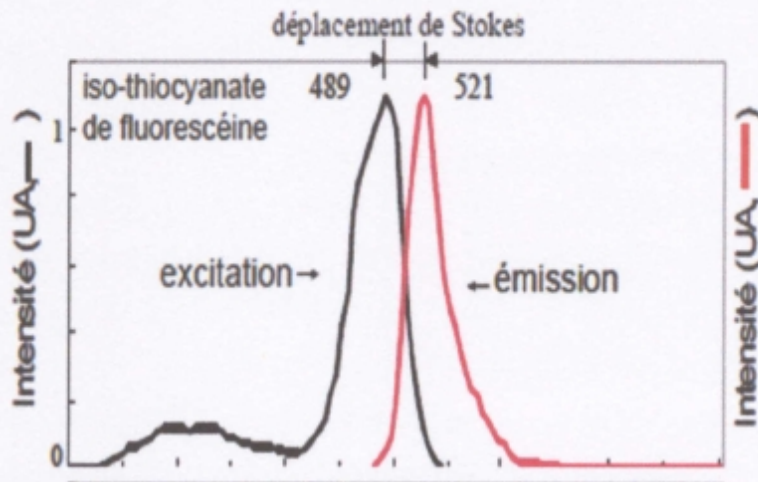


Figure 2: Spectre d'absorption et d'émission de la fluorescéine (17)

b. Le rendement quantique:

le rendement quantique est le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Ce rendement est toujours inférieur à 1, il est souvent très faible, et de nombreux paramètres comme le pH du milieu, la liaison du fluorochrome à une substance, les caractéristiques physiques du milieu,.....etc. diminuent ce rendement(16)

Il détermine l'efficacité de l'émission de lumière fluorescente pour une molécule donnée (14).

c. Le coefficient d'extinction :

L'intensité d'absorption (optical cross-section of a molecule) ou coefficient d'extinction ou absorbance spécifique reflète la probabilité d'absorption. Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des colorants ; plus est grand, plus élevée sera la fluorescence a intensité lumineuse incidente égale(14).

NB:

L'intensité de fluorescence ou « brillance » d'une sonde est déterminée par le produit du coefficient d'extinction et du rendement quantique.

d- La durée de vie de fluorescence:

La quatrième caractéristique importante d'une molécule fluorescente est le temps de déclin, ou durée de vie de fluorescence, Elle correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité. La plupart des fluorochromes ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde. Plus ce temps sera court, meilleur sera la sensibilité du fluorochrome. En effet, plusieurs excitations successives seront possibles car il repassera rapidement dans son état fondamental (14). Il est toutefois bien connu que l'intensité de la fluorescence des préparations baisse graduellement au cours de l'examen microscopique. On remédiera donc à cet inconvénient majeur en additionnant au liquide de montage certains produits chimiques qui auront pour effet de retarder la diminution de la fluorescence. Ces produits sont généralement appelés antifading (voire Annex III)(12).

III.4. 3 /Fluorochromes couramment utilisés en microscopie à fluorescence :

Les fluorochromes utilisables doivent posséder un certain nombre de qualités qui limitent le nombre des corps utilisés : spectre d'émission situé dans le visible, rendement quantique élevé, fluorochrome aisément différenciable de l'auto-fluorescence. Il est en outre nécessaire d'employer un dérivé possédant une fonction chimique qui permet une liaison covalente avec le réactif immunologique, cette liaison ne doit pas modifier les propriétés immunologiques du conjugué, en pratique courante, seules sont employées la fluoresceine et la rhodamine pour l'immunofluorescence classique. Mais de nouvelles molécules pour la cytométrie de flux ou le dosage fluorométrique sont apparues.

3.1/Dérives de la fluoresceine :

La fluoresceine est le fluorochrome de loin le plus utilisé, son spectre d'absorption comprend 3 bandes principales ; A à 490 nm, B à 320 nm et C à 280 nm, son spectre

d'émission (bandes a, b et c) situé dans le visible, se trouve vers 520 nm donnant une couleur verte. la bande C est inutilisable car elle émet surtout dans UV, la bande d'absorption B à 320 nm est souvent utilisé malgré son absorption assez faible et sa médiocre excitabilité par les pics 312 nm et 334 nm de la lampe à mercure la bande d'absorption A situé à 490 nm ,la plus importante et très proche de sa bande d'émission à située à 520 nm n'a pu être utilisés que grâce à l'emploi de filtres interférentiels très sélectifs pour la fluorescéine, en pratique on utilise(17) :

*** L'isothiocyanate de fluorescéine(FITC) :**

L'intensité de la fluorescence est maximale à pH 7,4 . L'isothiocyanate de fluorescéine est stable sous forme de poudre amorphe, et se conserve bien à température ambiante (température de laboratoire) à l'abri de la lumière . Il possède en outre une solubilité suffisante dans l'eau pour permettre la conjugaison sans solvant organique, mais son rendement quantique s'effondre à 0,15 après conjugaison avec les protéines, elle est excellent au départ et égale à 0,85(17) (figure 3) .

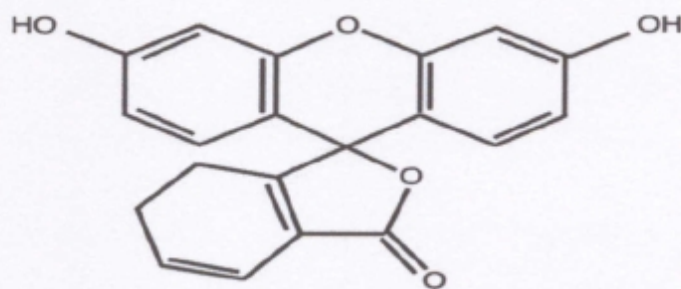


Figure 3 : Fluorescéine (16).

3.2/Rhodamine :

Ce fluorochrome est moins utilisé que la fluorescéine, son spectre d'absorption est maximum dans l'ultraviolet (< 410 nm), son spectre d'émission est alors dans le jaune-rouge (550-620 nm), facilement distinguable de celui de la fluorescéine. Cette différence dans le spectre d'émission de ces deux fluorochromes permet leur utilisation conjointe pour réaliser un double marquage. Sur un plan pratique, on préfère utiliser le chlorure de l'acide sulfonique de la lissamine rhodamine B200 (RB200), qui présente le même spectre d'émission que la rhodamine et se couple aux fonctions aminées des protéines (fig. 4).

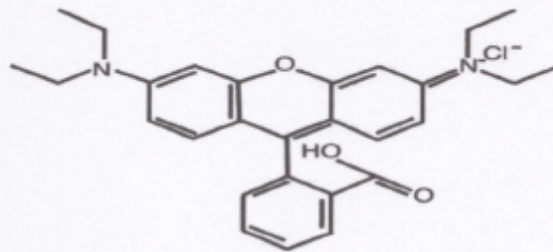


Figure 4: Rhodamine(16).

3.3/ La phycoérythrine :

La phycoérythrine absorbe 30 x plus la lumière que la fluorescéine et émet une fluorescence rouge intense. Souvent utilisée dans la cytométrie de flux (fig.5)

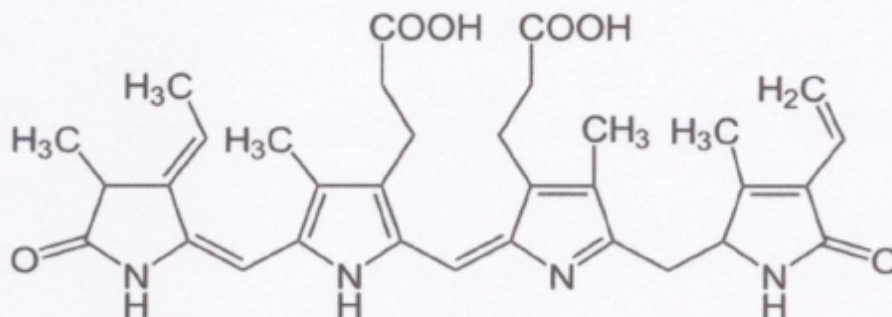


Figure 5 : Phycoérythrine (16)

NB :

Fluorochromes récents : L'Europium, Samarium, le Terbium, sont plus spécifiques par élimination des phénomènes parasites.

III.4.4/ Facteurs influençant la fluorescence :

Divers conditions expérimentales permettant de rechercher une intensité de fluorescence maximale :

1/Source d'excitation :

L'état excité de la molécules étant court, on peut accroître l'intensité de la fluorescence en augmentant l'intensité d'excitation sans modifier notablement le rendement quantique, dans les limites de la stabilité de la molécules. L'utilisation des lampes puissantes est hautement souhaitable(13).

2/Concentration en fluorescence:

L'intensité de la fluorescence augmente aussi proportionnellement avec la quantité de fluorochrome utilisé, cependant à partir d'une certaine limite, la brillance n'est plus proportionnelle à la concentration en fluorochromes en raison de l'interaction des molécules de fluorochromes entre elles (13).

3/Facteurs environnants :

Le pH du milieu modifiée nettement la fluorescence en raison des changements d'équilibre d'ionisation de la fluorescence double en passant d'un pH 6 à 7,4, c'est la raison pour laquelle la réaction immunologique est réalisée dans un tampon physiologique de pH de 7,2 à 7,4(13).

III. 5/Système optique de détection de la fluorescence (microscopie à fluorescence) :

La microscopie à fluorescence est un instrument courant et très sensible pour examiner la distribution des molécules dans une cellule (18).

III.5.1/Les éléments constitutifs de la microscopie à fluorescence:

III.5.1/Source lumineuse:

En microscopie à fluorescence, la source lumineuse doit émettre un rayonnement d'excitation adapté aux caractéristiques physiques du fluorochrome utilisé(19).

a-Lampes à incandescence à vapeur d'halogène:

Ces lampes à incandescence sont d'utilisation pratique, car elles supportent la possibilité d'être éteintes et allumées à tout moment, et fournissent un spectre continu qui augmente régulièrement à partir de 400 nm(19).

b-Lampes à vapeur de mercure :

Pour travailler en fluorescence, ce type de lampe est le matériel de choix car le spectre d'émission est discontinu, riche en ultraviolets et en bleu-violet. Cependant, outre le fait qu'elles soient onéreuses, elles nécessitent quelques précautions d'emploi. Elles ne supportent pas de nombreux amorçages successifs, et ne doivent pas être éteintes dans les 15 premières minutes d'utilisation. De même, elles ne peuvent être remises en marche immédiatement après extinction. Après usage, leur élimination doit faire l'objet d'une procédure spécifique à l'élimination du mercure(19).

La durée de vie moyenne des lampes à mercure est de 200 heures indiquée par le fabricant pour des fonctionnements de 2 heures n'est en fait que de 100 à 150 heures (utilité d'un compteur horaire) de nombreux amorçages raccourcissent la durée de la lampe avec, par exemple, une diminution de 50% pour les allumages toutes les 20 minutes. La lampe ne peut être remise en marché immédiatement sans risque après extinction et elle ne doit pas être éteinte pendant les 15 premières minutes tant que le mercure n'est pas totalement vaporisé. Une lampe ayant dépassé son temps de d'utilisation a beaucoup de chance d'étaler (13).

III.5.2/ Filtres:

a-Filtres d'excitation:

Également appelés filtres primaires, ils permettent d'éliminer les rayonnements parasites et de ne sélectionner, pour éclairer l'objet, que la longueur d'onde d'excitation utile et adaptée au fluorochrome utilisé (19).

b-Filtres d'arrêt:

Ils vont permettre de sélectionner la longueur d'onde du rayonnement émis, limitant ainsi le bruit de fond lié aux émissions parasites. Ils permettent d'arrêter le rayonnement ultraviolet (UV) et de protéger l'observateur (19).

III.5.2/Miroir dichroïque:

Le miroir dichroïque a la propriété de réfléchir un rayonnement de longueur d'onde inférieure à une valeur donnée, alors qu'il est traversé par les rayonnements de longueur d'onde supérieure à cette même valeur (19).

III.5.2/ Le fonctionnement de la microscopie a fluorescence:

Le rayonnement d'excitation pénètre dans le tube du microscope, entre l'oculaire et l'objectif. Il est réfléchi sur un miroir dichroïque, traverse le filtre d'excitation situé entre le miroir et l'objectif, atteint la préparation de haut en bas. L'objectif a alors la fonction du condenseur, dirigeant le rayonnement vers l'objet. Le trajet lumineux se réfléchit à 180°, et le rayonnement d'émission se dirige alors vers le haut, traversant de nouveau l'objectif, le filtre d'excitation, le miroir dichroïque puis l'oculaire. Un filtre d'arrêt situé sous l'oculaire protège l'observateur et limite le bruit de fond(19).

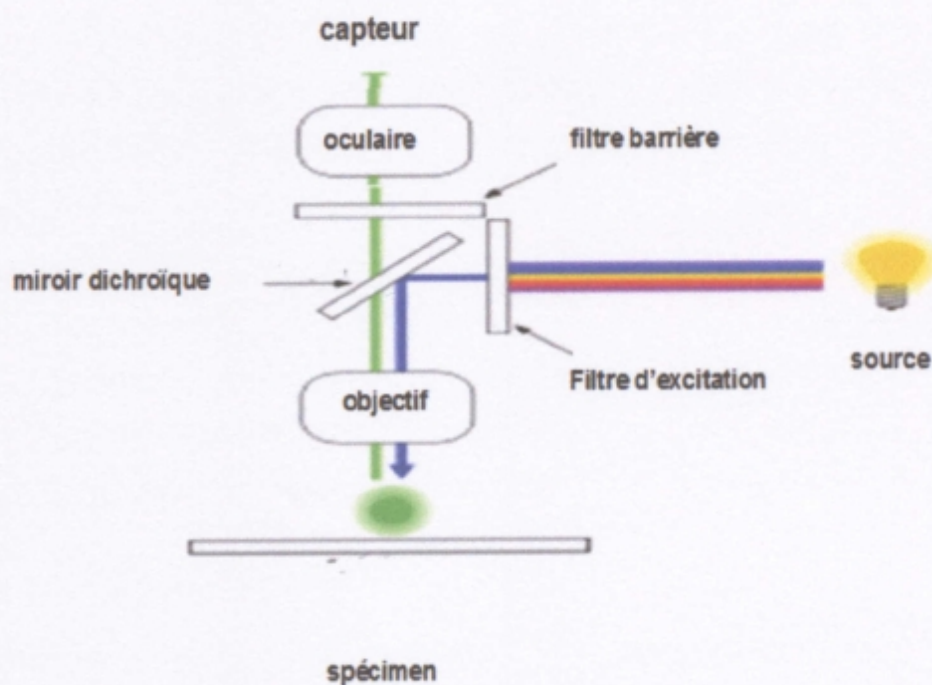


Figure 6 : Trajet de la lumière dans un microscope en épifluorescence(19).

IV /Procédure et exécution du test :

IV.1/Le matériel(20) :

IV.1 .1/ Les réactifs :

- Lames de substrat composé d'un nombre des puits.
- Conjugué lié au fluorochromes.
- Le diluant IF.
- Milieu de montage.
- PBS en poudre.
- Contrôle Négatif.
- Contrôle positif des différents aspects en cas de plusieurs aspects.
- Lamelles de verre.

IV.1.2/Matériel nécessaire non fourni :

- Flacon ou éprouvette graduée d'un litre.
- Eau distillée.
- Récipient à bouchon d'un litre.
- Tubes à essais jetables et un portoir.
- Pipettes sérologiques jetables.
- Pipettes volumétriques de 10 μ l et 100 μ l, avec des cônes jetables.
- Pipettes Pasteur.
- Chambre humide.
- Pissette en plastique.
- Jarres Coplin ou cuves à coloration avec support pour lames.
- Lamelles, No.1, 24 x 60 mm.
- Stylo feutre noir à encre indélébile.
- Microscope fluorescent équipé d'une source de lumière à mercure ou halogène à base de tungstène, d'un filtre d'excitation de 340-490 nm et un filtre d'émission de 515-52 nm, et d'un objectif permettant un grossissement total de 400x. La longueur d'onde d'excitation du FITC est de 490 nm et la longueur d'onde d'émission est de 520nm.

IV.2/ Stabilité et conditions de conservation des réactifs(20) :

Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine. Ne pas utiliser un coffret ou un réactif dont la date de péremption est dépassé.

IV.3/ Préparation des réactifs(20) :

-Préparation de la solution tampon :

Verser le contenu d'un sachet de PBS dans un récipient volumétrique d'1 litre, ajouter de l'eau distillée jusqu'à la marque de graduation 1l, mélanger et laisser le mélange se dissoudre durant plusieurs heures ou toute une nuit. La solution tampon reconstituée doit avoir un pH de $7,4 \pm 0,2$. Si la valeur du pH se situe en dehors de cette tranche, ajuster avec du 1N NaOH ou du 1N HCl. Conserver la solution tampon dans une bouteille propre et fermée par un bouchon à une température $\leq +25^{\circ}\text{C}$. La solution ainsi conservée reste stable pendant un

mois à condition qu'aucune contamination importante ne soit visible. Ne pas utiliser si le pH change, si la solution devient trouble ou si un précipité se forme.

Utiliser l'eau distillé avec prudence car le pH de cette eau peut varier et provoquer une grande instabilité sur le pH du PBS lors des conservations prolongées.

IV.4/ Précautions d'emploi(20) :

- ✓ Réservé à l'usage de diagnostic *in vitro*.
- ✓ Ne pas enlever les lames des sachets avant que tout soit prêt pour tester. Ne pas utiliser si le sachet a été percé, dans ce cas le sachet sera plat.
- ✓ Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (+20°C-+25°C) avant d'être utilisés.
- ✓ Des résultats anormaux peuvent être rencontrés si les lames de substrat d'antigènes sèchent pendant la procédure de coloration.
- ✓ La réfrigération (à +2°C-+8°C) du kit de réactif immédiatement dès son arrivée assure sa stabilité jusqu'à la date limite de péremption indiquée.
- ✓ Les réactifs ne doivent pas être utilisés après la date limite de péremption.
- ✓ La substitution des composants par d'autres composants non fournis dans le coffret peut conduire à des résultats incorrects.
- ✓ Ne pas exposer le conjugué à une lumière intense pendant le stockage ou l'utilisation.
- ✓ Eviter la contamination microbienne de tous les réactifs impliqués dans le protocole afin d'éviter l'apparition de résultats incorrects.
- ✓ Tout changement dans le protocole défini, comme les temps d'incubation ou les températures, peut donner des résultats erronés.
- ✓ Les sérums lipémiques, hémolysés ou contaminés peuvent conduire à des résultats erronés.
- ✓ Les échantillons congelés doivent être parfaitement mélangés et homogénéisés après décongélation avant d'être testés.
- ✓ La verrerie réutilisable doit être lavée et parfaitement rincée.
- ✓ Eviter les éclaboussures et la génération d'aérosol.
- ✓ Conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2, les échantillons de patients et toute matière qui rentre en contact avec eux doivent être manipulés comme

pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel CDC/NIH « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », Edition 1984.

- ✓ Ne jamais pipeter avec la bouche. Eviter tout contact avec la peau et les muqueuses.
- ✓ Les sérums humains utilisés pour préparer les contrôles positifs et négatifs ont été testés et se sont révélés négatifs (non réactivité répétée) vis-à-vis de l'antigène HBs et des anticorps de l'hépatite C et anti-HIV 1 et 2 selon les méthodes approuvées par la FDA. Parce qu'aucun test ne peut assurer totalement leur absence comme celle d'autres agents infectieux, ces réactifs doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de Biosécurité 2 du Manuel CDC/NIH « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », Edition 1984 », comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux.
- ✓ Les conservateurs utilisés dans les conjugués et les contrôles sont toxiques par ingestion. Les azides peuvent réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des acides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment avec de l'eau, afin d'éviter toute accumulation de résidus.
- ✓ Le diluant IF doit être utilisé uniquement comme diluant pour les échantillons de patients. Ne pas effectuer de dilution en série pour un titre en point final avec le diluant IF. Ne pas utiliser dans les étapes de lavage.

IV.5/Mode opératoire(20) :

IV.5.1/Préparation des échantillons :

Dépistage :

Préparer une dilution qui correspond au type de l'anticorps recherché pour chaque sérum en ajoutant le sérum au diluant IF ou de PBS.

Remarque : Prélever seulement la quantité de diluant nécessaire pour faire chacune des séries de tests afin de réduire les possibilités de contamination du produit.

Semi-quantification :

Le résultat significatif positif de dépistage doit être confirmé en répétant le test avec des dilutions du sérum. Chaque laboratoire doit établir son propre protocole de titration ; cependant, la procédure suivante est suggérée par exemple pour la recherche des ANA :

a. Préparer une dilution à 1/40 pour chaque sérum de patient en ajoutant 0,01 ml (10 µl) de sérum du patient à 0,39 ml de diluant IF ou de PBS.

b. Ajouter 0,3 ml de PBS dans les tubes #2, #3, #4 et #5. (Ne pas utiliser le Diluant IF pour les dilutions en série.)

c. En utilisant une pipette de 100 µl, transférer 0,1 ml (100 µl) du tube #1 au tube #2. Mélanger. Puis, en utilisant un nouvel embout pour chaque dilution, transférer 0,1 ml (100 µl) du second tube au troisième, du troisième au quatrième, et du quatrième au cinquième, en mélangeant après chaque transfert. La gamme de titration avec les dilutions correspondantes est la suivante:

Tube #1 = 1/40

Tube #2 = 1/160

Tube #3 = 1/640

Tube #4 = 1/2560

Tube #5 : 1/10240

Remarque:

Les contrôles positifs et négatifs ne doivent pas être dilués. Cependant, si l'on effectue un test semi-quantitatif, le contrôle positif peut être dilué comme décrit précédemment. Cependant, ne pas utiliser le diluant IF pour faire la dilution 1/40 ou toute autre dilution du contrôle positif.

IV.5.2/Préparation des lames :

Retirer autant de lames que nécessaires du réfrigérateur et les laisser s'équilibrer à la température ambiante (+20°C-+25°C) pendant au moins cinq minutes. Enlever les lames des sachets scellés en aluminium, en évitant tout contact avec la surface de la lame. Identifier chaque lame à l'aide d'un stylo noir indélébile.

IV.5.3/ Dépôt de l'échantillon :

En utilisant des pipettes Pasteur différentes, déposer une goutte (20-30µl) de chaque contrôle et une goutte de sérum dilué de chaque patient dans les puits individuels de la lame. Ne pas toucher la surface antigénique avec la pipette pendant le dépôt des gouttes. Eviter que les gouttes se mélangent car la contamination croisée des échantillons entre les puits peut entraîner des résultats erronés.

IV.5.4/ Incubation 1 :

Incuber dans une chambre humide à température ambiante (+20°C- +25°C) pendant 30 minutes.

NOTE : l'antigène ne doit pas sécher pendant l'une des étapes suivantes. Des liaisons non spécifiques peuvent apparaître si les réactifs sèchent sur la lame.

IV.5.5/ Rinçage 1 :

Enlever les lames de la chambre humide une par une et rincer délicatement avec du PBS à l'aide d'une pissette de lavage. Ne pas centrer le jet de PBS directement sur les puits. Afin d'éviter les contaminations croisées incliner d'abord la lame sur le côté des puits (1- 6 ou 1-8), et diriger le jet de PBS le long de la ligne médiane de la lame.

Ensuite, incliner la lame sur le côté des puits (7-12 ou 9-16) et répéter cette procédure, permettant ainsi au PBS de couler jusqu'à l'extrémité de la lame. Pour les lames de 6 puits, incliner la lame vers le bas et diriger le jet à travers la lame par-dessus les puits, en laissant le PBS couler jusqu'à l'extrémité de la lame.

IV.5.6/ Lavage 1 :

Placer les lames dans une jarre de Coplin ou une cuve à coloration et laver en changeant deux fois de tampon PBS pendant 5 à 6 minutes pour chaque lavage. Agiter délicatement au moment de l'immersion et du retrait de la lame du tampon PBS. Eliminer le PBS en excès si nécessaire et sécher la tranche de la lame avec du papier absorbant.

IV.5.7/ Dépôt du conjugué :

Retirer les lames une par une, enlever le PBS en excès, sécher autour des bords extérieurs si nécessaire et remettre chaque lame dans la chambre humide. Utiliser le compte-goutte fourni et déposer une goutte de conjugué (30-50 μ l) dans chaque puit de la lame en faisant attention que le puit soit complètement recouvert.

IV.5.8/ Incubation 2 :

Incuber dans la chambre humide à température ambiante (+20°C - +25°C) pendant 30 minutes. Protéger les lames de la lumière excessive.

IV.5.9/ Rinçage 2 :

Enlever les lames de la chambre humide et rincer délicatement avec le PBS à l'aide de la pissette de lavage. Comme suggéré dans l'étape 5, ne pas centrer le jet de PBS directement sur les puits.

IV.5.10/ Lavage 2 :

Placer les lames dans une jarre de Coplin ou une cuve à coloration et laver en changeant deux fois de tampon PBS pendant 5 à 6 minutes pour chaque lavage. Agiter délicatement au moment de l'immersion et du retrait de la lame du tampon PBS. Eliminer le PBS en excès si nécessaire et sécher la tranche de la lame avec du papier absorbant.

IV.5.11/ Lamelle couvre-objet :

Enlever les lames une par une du tampon de PBS, éliminer le tampon PBS en excès et ajouter immédiatement 2 à 4 gouttes de milieu de montage sur la ligne médiane de chaque lame. Pencher la lame sur le côté et reposer le bord de la lamelle contre le bas de la lame permettant au milieu de montage de former une goutte continue entre la lame et la lamelle. Abaisser délicatement la lamelle du bas de la lame vers le haut, en évitant de former des bulles d'air. Eliminer l'excès de milieu de montage en essuyant le bord de la lame avec un papier absorbant.

Nettoyer le dessous de la lame.

IV.5.12/ Lecture :

Examiner les lames dès que possible en utilisant un microscope à fluorescence correctement équipé. Il est recommandé d'examiner les lames le jour même où elles ont été faites. En cas de lecture retardée, conserver les lames au réfrigérateur (+2°C-+8°C) à l'abri de la lumière directe et les lire le lendemain. Ne pas laisser sécher le milieu de montage entre lame et lamelle. Si le liquide s'évapore, ajouter du milieu de montage et recouvrir la lame.

IV.6/ Echelle d'intensité fluorescente :

L'intensité de fluorescence peut être semi-quantitative à l'aide des directives établies par le « Center for Disease Control », Atlanta, Géorgie.

4+= Fluorescence maximale ; jaune vert intense

3+= Fluorescence jaune vert moins intense

2+= Faible fluorescence jaune vert terne

1+= Fluorescence très faible

Le degré d'intensité de fluorescence n'est pas cliniquement significatif et peut être seulement un indicateur pour le titre final de l'échantillon.

Les différents types d'objectifs de microscope, de filtres et de sources lumineuses du microscope à fluorescence peuvent entraîner des variations de résultats d'un grade 1+ ou plus au niveau de l'intensité lumineuse lorsque la même lame est observée sur plusieurs microscopes différents.

IV.7/ Contrôle de qualité(20) :

IV.7.1/ Contrôle de spécificité :

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série d'essai. Ces contrôles doivent être examinés avant de lire les échantillons tests et doivent démontrer les résultats suivants :

a. Contrôle négatif :

En utilisant le sérum de contrôle négatif fourni avec coffret de réactif, les cellules doivent présenter une intensité de fluorescence moins que 1+ fluorescence et apparaître rouge orangé à cause du contre colorant.

b. Contrôle positif :

En utilisant le sérum de contrôle positif fourni avec le coffret de réactif, les cellules doivent présenter une intensité de fluorescence de 3+ à 4+ avec un aspect homogène.

Chaque contrôle doit être conforme à la réaction attendue afin de valider le test. Si les contrôles n'apparaissent pas comme décrit auparavant, les résultats des tests ne sont pas valables et le test doit être recommencé.

Si malgré un deuxième essai les contrôles ne présentent toujours pas les aspects attendus, alors ne pas utiliser les résultats.

La spécificité du substrat antigénique peut être testée ultérieurement grâce à un panel d'anticorps.

IV.7.2/ Contrôle de sensibilité :

Un contrôle titrable est inclus dans chaque série d'essai pour déterminer la sensibilité du substrat, mais aussi contrôler le protocole, la qualité du conjugué et le système du microscope optique. Le titre attendu de chaque lot de contrôle de sérum positif ANA doit être déterminé. Il ne doit pas y avoir une différence de plus de deux dilutions par rapport à la valeur attendue. Chaque essai doit inclure la dilution ciblée ainsi qu'une quadruple dilution au dessus de la valeur cible et une quadruple dilution en dessous de la valeur cible. La dilution la plus concentrée doit être positive et la moins concentrée doit être négative. Si le contrôle ne se comporte pas de manière attendue, les résultats du test sont invalides et le test doit être recommencé. Si le contrôle ne présente toujours pas les aspects attendus, alors ne pas utiliser les résultats

IV.8/ Résultats :**IV.8.1/ Négatif :**

Une dilution de sérum est considérée comme négatif pour les anticorps antinucléaires si les cellules montrent une intensité de fluorescence inférieure ou égale à 1+ sans motif clairement visible. Les cellules vont apparaître rouge orangé à cause de la contre coloration du Bleu d'Evans. Un échantillon est considéré négatif vis-à-vis des anticorps antinucléaires par exemple s'il présente une intensité de fluorescence inférieure à 1+ pour une dilution au 1:40

et ainsi que pour toutes dilutions plus importantes ou si la fluorescence observée ne présente pas de motif clair et visible. Les échantillons négatifs peuvent présenter des fluorescences légèrement plus intenses que le contrôle négatif mais inférieures à 1+. Certains sérums peuvent toujours montrer un faible degré de fluorescence cytoplasmique ou nucléaire sans motif clair et visible. Ce phénomène est généralement dû aux anticorps hétérophiles et doit être reporté comme négatif (21). Une coloration intense non nucléaire peut être observée dans certains sérums contenant des anticorps anti-mitochondries, anti-muscle lisse, ou d'autres anticorps cytoplasmiques.

IV.8.2/ Positif :

Une dilution de sérum est considérée comme positive pour les anticorps antinucléaires si la fluorescence présente une intensité supérieure à 1+ avec un motif clairement visible.

Un échantillon est considéré positif vis-à-vis des anticorps antinucléaires par exemple s'il présente un aspect caractéristique des colorations ANA avec une intensité de fluorescence 1+ ou plus pour une dilution de sérum au 1:40 ou plus.

Les anticorps antinucléaires multiples peuvent être présents dans un échantillon donné ; un type d'anticorps peut masquer la présence des autres.

Les dilutions successives des échantillons peuvent aider à distinguer ces aspects.

Noter tous les titres et les aspects correspondants.

IV.8.3/ Titration :

Si une titration semi quantitative est réalisée, le résultat doit être communiqué comme l'inverse de la dernière des dilution successives pour laquelle l'intensité de fluorescence vert pomme 1+ ou plus avec un discernement clair et visible est détecté. Lors de la lecture des quadruples dilutions successives, le titre peut être déterminé par extrapolation si nécessaire.

VI/ Les applications de l'immunofluorescence :

V.1/Auto-immunité :

De nombreux auto-anticorps présents au cours des maladies auto-immunes reconnaissent des antigènes cellulaire ou des antigènes spécifiques ou non d'organes. L'immunofluorescence indirecte permet aisément de les déceler ,cependant elle nécessite

toujours un complément d'étude pour préciser la spécificité immunologique en raison de la multiplicité des antigènes cellulaire présents, notamment au niveau du noyau et la diversité des anticorps dans un même sérum. L'immunofluorescence indirecte sur frottis cellulaire ou coupes d'organes, reste actuellement la méthode de routine la plus utilisée pour dépister de nombreux auto-anticorps(13).

V.1.1/ Auto-anticorps anti-nucléaires:

Divers substrats peuvent être utilisés en raison de la non spécificité d'organes et d'espèce de la plus part des anticorps antinucléaires cependant, la comparaison des résultats entre les laboratoires nécessite de se limiter au coupes de foie de rat ou mieux aux cellules HEP-2 et HEP-2000 cultivées sur lames, celle-ci en raison des anti-centromère rarement visibles sur le foie de rat, l' utilisation de hypanosomides en particulier *Crithidia lucilæae*, permet de détecter des anticorps anti-ADN double brin, permet de détecter les anticorps anti-ADN bicaténaire sur le kinétoplaste ce teste cependant légèrement moins sensible que la méthode de Farr (13).

V.1.2/ Anticorps anti-organites intracytoplasmiques :

Divers auto-anticorps observés en hépatologie (anticorps anti mitochondrie ; anti muscle lisse ; anti-microsome de foie et de rein) sont simultanément décelables si on teste le sérum sur des coupes d'un bloc associant foie ,rein et estomac de rat ou de souris. L'aspect de la fluorescence permet de reconnaître divers types de d'anticorps, chacun particulier d'une maladie hépatique différente. Les anticorps anti-muscle lisse peuvent être caractérisés comme anticorps anti-cytosquellette (microfilaments d'actine ; filaments intermédiaire de vimentine...) sur des fibroblastes ou des cellules HEP-2 cultivées en présence de colchicine(13).

V1.3/ Anticorps spécifiques d'organes :

Enfin d'autres auto-anticorps reconnaissent un Ag présent au niveau d'un organe ou d'un type cellulaire particulier. Ils sont décelables sur des coupes d'organes. Nous ne citerons que les anticorps les plus recherchés : Ac anti-microsome de cellules pariétale d'estomac , Ac anti-microsome de la thyroïde, anti-ilots de Langerhans, anti-microsome de corticosurrénale,

anti-substance intercellulaire de l'épithélium malpighien ,anti-membrane basale d'épithélium malpighien et paramalpighien, et anti-muscle strié.

En raison des anticorps non spécifiques d'organes, en particulier les Ac anti-mitochondrie, il est nécessaire d'adjoindre une coupe de rein pour éliminer cette possibilité(13).

V.2/ Microbiologie :

V.2.1/ Bactériologie :

Touts les liquides biologiques se prêtent à l'identification par immunofluorescence directe des agents infectieux, à condition de disposer d'un prélèvement suffisant riche et d'anticorps marqués pécifiques. L'emploi d'anticorps monoclonaux marqués a amélioré la spécificité de ce procédé(13).

V.2.2/ Virologie :

L'IFI permet de suivre la cinétique de multiplication d'un virus mis en culture *in vitro* ; on suivra dans le temps l'apparition d'antigènes cellulaires et viraux. Simultanément on examinera des lames de contrôle négatives, colorées en même temps que les lames étudiées, par les anticorps marqués.

L'IFI est aussi utilisée dans la recherche des virus responsables des infections respiratoires. Le virus responsable peut être mis en évidence dans des cellules de prélèvement approprié ou après culture cellulaire(13).

V.2.3/ Recherche d'anticorps anti-microorganismes :

L'IFI permet de détecter des Ac circulants, leur évaluation éventuelle ainsi que la détermination de leur classe IgG ou IgM et même éventuellement leur sous-classe.

Elle nécessite de posséder l'Ag fixé sur lame et les antiglobulines anti-classe ou anti sous-classe des Ig de l'espèce animal ou humain étudiée, marquées à la l'isothiocyanate de fluorescéine. (13).

VI/ Facteurs influents l'IFI :

Le devoir du biologiste est de maîtriser la connaissance de tous les paramètres pour produire, à partir des faits observés, une conclusion qui ne soit pas erronée. L'absence de

réaction positive ne signifie pas l'absence d'anticorps, de même que l'existence d'une fluorescence ne signe pas à tout coup leur présence(21).

VI.1/ Paramètres liés au substrat :

La cible, le substrat, est le premier élément à prendre en compte.

- Il faut affirmer que le substrat contient l'antigène dans sa bonne conformation épitopique.
- Il peut arriver que l'antigène soit masqué par des molécules combinées, nécessitant le traitement préalable de la coupe par un agent dénaturant (urée par exemple), comme c'est le cas pour la recherche des anticorps anti-membrane basale glomérulaire sur rein de singe.
- Pour s'assurer que l'antigène soit présent après la fixation du substrat (car il peut dénaturer les antigènes) on doit tester les lames à chaque changement de lot en appréciant les paramètres critiques (richesse et morphologie cellulaire, nombre de cellules en mitoses pour les cellules HEp-2, distribution et qualité des différents tissus) vis-à-vis de sérums témoins validés car de spécificité connue(21).

VI.2/ Paramètres liés au sérum :

- La recherche des autoanticorps s'effectue sur du sérum qui peut être conservé au maximum 48 heures à + 4 °C, ou congelé à – 20 °C pour des périodes de conservation plus longues.
- Il est classique de diluer le sérum dans du tampon phosphate salin (0,01 M pH 7,4, 0,15 M NaCl) additionné éventuellement de Tween 20 (0,05 %) et d'albumine bovine (2 %) pour diminuer la fluorescence non spécifique (22).
- La dilution de dépistage varie avec chaque autoanticorps, le bruit de fond étant donné par un sérum humain normal à la même dilution passé obligatoirement dans chaque série.
- Concernant le titre et la pratique de dilution de dépistage, il faut garder à l'esprit la possibilité du **phénomène de prozone** (23) s'expliquant, pour les anticorps de titre très élevé, par l'inaccessibilité des épitopes isotypiques pour le conjugué quand il y a trop d'autoanticorps fixés, et entraînant donc une fausse négativité.
- L'interprétation d'une recherche positive doit tenir compte de l'âge : si la présence d'anticorps antinucléaires, détectés par IFI sur cellules HEp-2, au titre du 1/100e est quasi physiologique chez un adulte âgé, il n'en est pas de même chez l'enfant. L'interprétation des fluctuations de titre doit être prudente(21).

VI.3/ Paramètres liés au conjugué :

- Le conjugué fluorescent, peut être polyvalent, reconnaissant les trois isotypes principaux (IgG, IgA et IgM : anti- δ , anti- α et anti- μ) ou restreint à la seule classe IgG (anti- δ) parce que la majorité des anticorps immuns sont de cet isotype. Avec ce deuxième type de conjugué, on risque de passer à côté de la majorité des anticorps monoclonaux, qui sont le plus souvent de nature IgM, et qui ne sont pas exceptionnels (23).
- Pour les coupes d'organes de primates, il est nécessaire d'utiliser un anti-sérum antiglobuline préalablement adsorbé avec des extraits d'organes de primates.
- Aucun consensus n'existe sur l'adjonction d'un contre-colorant comme le bleu d'Evans pour faciliter la lecture(21).

VI.4/ Paramètres liés à la lecture au microscope :

- La maintenance de la microscopie à fluorescence est un facteur clef de la qualité de la lecture (réglage du faisceau lumineux, degré d'usure de la lampe).
- La lecture est observateur dépendante, certains lecteurs étant plutôt lynx et d'autres plutôt taupes. L'entraînement des techniciens et des biologistes doit faire en sorte qu'il n'y ait pas plus d'une dilution de différence entre deux personnes pour une même lecture.
- En fonction de l'habitude de lecture et le façonnage de l'œil, la lecture peut se faire à sec ou à immersion(21).

VII/ Problèmes posés par l'interprétation de l'immunofluorescence :

Outre de la diminution de l'intensité de la fluorescence au cours de l'observation et de l'appréciation subjective des degrés de fluorescence, de nombreuses causes d'erreur doivent être évitées(13).

VII.1/ Réactions faussement positives :

Divers fausses réactions positives peuvent s'observés en raison des causes suivantes :

a- Autofluorescence bleue-verte des tissus : La composante verte de l'autofluorescence filtre avec l'émission de la fluorescéine. Elle est révélée par l'observation directe de la préparation non traitée et peut être diminuée par l'utilisation de filtres adéquats.

b- Effet de charge : Ce facteur peut être important dans la coloration non spécifique des préparations cellulaires. C'est la propriété que possèdent les immunoglobulines de charge électro négative, et surtout les Ig marquées, de se fixer sur toute molécule chargée positivement, par des liaisons uniquement électrostatiques. Les anticorps marqués se comportent alors comme des colorants acides et se fixent sur toute structure cellulaire éosinophile. L'altération des cellules et surtout la nécrose, plus que la déshydratation, renforcent cet effet en augmentant les charges positives des cellules. Cet effet est particulièrement net avec les cellules infectées par un virus à développement intracytoplasmique, qui donnent une fluorescence non spécifique du virus, avec toute Ig immunofluorescente. C'est à dire l'intérêt d'un témoin constitué d'Ig marquées non anti-virales, pour toute réaction d'immunofluorescence en virologie.

c - Récepteurs pour le fragment Fc des Ig : Cette fausse réaction positive sur les cellules comportant des récepteurs pour le Fc des Ig est supprimée en utilisant un conjugué F(ab')₂.

d- Présence de facteurs rhumatoïdes : Leur présence dans des sérums à étudier riches en IgG spécifiques donne une fausse positivité lors de la recherche et du titrage des IgM spécifiques par IFI.

e- Présence d'autres anticorps : Dans les réactions d'IFI appliquées au diagnostic de maladies virales, ces anticorps se lient aux cellules de la préparation virale et donnent une fluorescence diffuse, réticulaire ou périphérique, touchant toutes les cellules, facile à différencier par expérience, de la fluorescence spécifique du virus infectant. C'est à dire l'intérêt d'un antigène cellulaire témoin non infecté, dans le sérodiagnostic des viroses(13).

VII.2/ Réactions faussement négatives :

A l'inverse une réaction positive peut apparaître négative pour les raisons suivantes :

a- Antigène autofluorescent ou hydrosoluble: L'autofluorescence de la préparation peut masquer une fluorescence spécifique. La solution est dans l'appareillage optique :

fluorescence en lumière réfléchiée et filtres interférentiels. Les antigènes hydrosolubles des préparations, même à l'état de complexes immuns, peuvent diffuser dans les solutions aqueuses utilisées. Ce risque est maximal avec les coupes non fixées.

b- Phénomène de zone ou de compétition : Une atténuation de la fluorescence peut être observée par un phénomène de prozone et les sérums doivent être étudiés à différentes dilutions. Une compétition entre IgM et IgG spécifique peut atténuer ou masquer la révélation des IgM spécifiques en IFI pour des sérums très riches en IgG. Il est donc recommandé d'éliminer les IgG totales par un traitement préalable du sérum avec un sérum anti-IgG humaines (13).

VIII/ Avantages et inconvénients de l'IFI :

VIII .1/ Avantages :

Les avantages de l'IFI sont nombreux :

a- Facilité d'exécution : deux incubations de 30 minutes entrecoupées de lavages, ne nécessitant que des dilutions du sérum à tester. À l'heure actuelle, l'IFI est rendue encore plus facile grâce aux automates de préparation de lames de fluorescence qui sont capables de réaliser les dilutions des échantillons à tester, le dépôt des dilutions effectuées et du conjugué sur les lames, les incubations et lavages des lames [6] ;

b- Sensibilité : l'IFI est environ 100 fois plus sensible que l'immunoprécipitation, comme le démontre la mise en évidence, à l'aide d'antisérums spécifiques de chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines, d'anticorps monoclonaux, alors même qu'il n'existe pas d'anomalie détectable à l'immunoélectrophorèse ou à l'immunofixation [13] ;

c- Possibilité de détecter plusieurs anticorps en même temps, puisque par définition le substrat est une mosaïque d'antigènes. Contrairement aux tests en phase solide où le plus souvent un seul antigène (ou un petit nombre d'antigènes définis) est couplé au support, l'IFI offre l'avantage de pouvoir répondre au-delà de la question posée par le clinicien. Ainsi, dans le cas d'une suspicion de lupus, il est certes important de répondre, par IFI sur cellules HEP-2 à la question de savoir s'il existe ou non des anticorps antinucléaires, mais il peut être également intéressant de signaler la présence d'anticorps anti-ribosomes ;

- **Maintien de l'antigène** dans sa conformation native et quasi assurance de détecter les autoanticorps dirigés contre tous les types d'épitopes, séquentiels et conformationnels.

VIII .2/ Les inconvénients ou les limites :

Les prérequis indispensables à l'IFI ne peuvent être appelés *inconvénients* qu'en cas de manque de disponibilité pour y satisfaire. Ils ne sont mis en avant que si le gain de productivité est le seul moteur du biologiste, comme c'est l'idéologie dominante au USA. Ces pré-requis sont :

- a- L'investissement dans un microscope à fluorescence avec des objectifs de qualité ;
- b- Le caractère non automatisable pour la totalité de la méthode avec le nécessaire contrôle de qualité de chaque étape ;
- c- L'expertise de lecture indispensable à une interprétation pertinente des résultats.

S'il utilise des réactifs commerciaux, le biologiste doit en connaître toutes les caractéristiques pour pouvoir interpréter avec pertinence les résultats. Les industriels doivent donc jouer la transparence et les mettre à disposition dans les notices techniques d'accompagnement (nature des antigènes, du conjugué, adsorption, fixation, etc.).

Compte tenu de tous les paramètres mis en jeu en IFI, pour les anticorps dont le titre peut être en corrélation avec l'activité clinique d'une maladie, seule une variation d'au moins trois dilutions entre deux titrages doit être considérée comme significative si l'on veut comparer les résultats de deux sérums d'un même patient prélevés et analysés à deux dates différentes.

Chapitre II

L'immunofluorescence et les maladies autoimmunes

I/ L'auto-immunité (rappel) :

L'auto-immunité résulte de l'immunisation d'un organisme contre ses propres constituants. Pourtant, le plus normal d'entre nous possède les lymphocytes B et/ou les lymphocytes T qui en sont responsables(24).

Le concept d'auto-immunité repose sur le principe d'un défaut de tolérance immunitaire, à l'origine d'une activation et une expansion clonale des lymphocytes T et B auto réactifs, de la production d'auto anticorps et d'une myriade de cytokines et autres médiateurs de l'inflammation (25).

La tolérance immunitaire est due à quatre mécanismes opérant selon le cas dans les organes lymphoïdes centraux ou dans les organes lymphoïdes périphériques : l'ignorance immunitaire, l'anergie, la délétion clonale et les cellules régulatrices. Une réaction auto-immune peut être déclenchée par le dysfonctionnement de l'un de ces mécanismes : des antigènes jusque-là masqués ou cryptique peuvent stimuler des lymphocytes qui les avaient ignorés jusqu'alors .des épitopes exogènes ayant une réactivité croisée avec des auto-antigènes peuvent lever l'anergie des lymphocytes spécifiques dans un contexte inflammatoire .un défaut d'apoptose peut nuire à la délétion de certaines clones auto-réactifs. Enfin, une inhibition des cellules régulatrices dans un contexte cytokinique pro-inflammatoire peut aussi favoriser l'émergence et la différenciation de clones auto-réactifs pathogènes (27).

Les principaux facteurs déclenchant une auto-immunité sont, d'une part, des gènes de susceptibilité qui peuvent être à l'origine des dysfonctionnements de la tolérance au soi, et, d'autre part, des facteurs environnementaux, comme les infections et les facteurs physico-chimiques, qui peuvent activer des lymphocytes auto-réactifs (26).

Les lésions observées au cours des maladies auto-immunes sont due aux différents mécanismes qui comprend aussi bien le rôle pathogène des auto-anticorps (anticorps cytolytique opsonisant, anticorps bloquant, anticorps stimulant et dépôt de complexe immuns) et le rôle pathogène des lymphocytes T (lymphocytes TCD 4 et lymphocytes TCD 8)(27)

II/ Les maladies auto-immunes :

Une maladie auto-immune se déclare lorsque l'organisme déclenche une réponse immunitaire adaptative délétère à l'encontre d'un des constituants du soi. Les lésions tissulaires qui découlent de cette réponse immunitaire dépendent de la localisation de l'auto-antigène.

Si celui-ci est confiné au sein d'un tissu ou d'un organe, les répercussions cliniques sont limitées à ce tissu et on parle de **maladies auto-immunes spécifiques d'organes**(M.A.I.S.O). En revanche, si l'auto-antigène est largement distribué dans l'organisme, les lésions sont disséminées au sein de différents tissus et on parle de **maladies auto-immunes non spécifiques d'organes**(M .A.I.N.S.O).(27)

II.1/ Les maladies auto-immune non spécifique d'organe (12):

II.1.1/ les connectivites :

- Le lupus érythémateux systémique.
- La polyarthrite rhumatoïde.
- La sclérodermie systémique.
- Le syndrome de Gougerot Sjôgren.
- Les myopathies inflammatoires ou myosites :
 - ✓ La polymyosite(PM).
 - ✓ La dermatomyosite(DM).
 - ✓ Myosites sporadiques à inclusions(MI).
- La connectivite mixte de Sharp.

II.1.2/ les vascularites :

- La périarthrite noueuse.
- La maladie de Wegener.

II.1.3/Syndromes des anti-phospholipides (APL).

II.2/ Les maladies auto-immunes spécifiques d'organe (M.A.I.S.O)(12):

Elles sont de plus en plus décrites.

II.2.1/ Les MAI du foie et des voies biliaires :

- Cirrhose biliaire primitive.
- Hépatite auto-immune de type 1.
- Hépatite auto-immune de type 2.
- Hépatite auto-immune de type médicamenteuse.
- Hépatite médicamenteuse immuno-allergiques.

II.2.2/ Les MAI de l'intestin :

- La maladie cœliaque.
- Les gastrites auto-immunes.
- La maladie de Crohn.
- Rectocolite hémorragique chronique.

II.2.3/ Les endocrinopathies auto-immunes :

- Le diabète insulino-dépendant de type 1.
- La thyroïdite de Hashimoto.
- La maladie de Basedow.

II.2.4/ Les maladies auto-immune de la peau :

- Pemphigus vulgaire.
- Pemphigus paranéoplasique.
- Pemphigus bulleux.
- Pemphigus foliacé.
- L'épidermolyse bulleuse acquise.
- Pemphigoïde cicatricielle.
- Herpes gestationnel.
- La dermatose linéaire à IgA.

II.2.4/ Les cytopénies auto-immunes :

- Les anémies hémolytiques auto-immunes (AHA).
- Le purpura thrombopénique auto-immunes.
- Les neutropénies auto-immunes.

II.2.5/ Autres moins fréquentes :

Les neuropathies périphériques auto immunes, cœur, poumon, rein, cartilage, oreille.....

III/ Les auto-anticorps :

III.1/ Généralités :

Toute personne produit des auto-anticorps mais en faible quantité (c'est les auto-anticorps **naturels** ou **physiologiques**) qui sont de classe IgM, de faibles affinités. Il est très probable que ces auto-anticorps naturels constituent une composante essentielle de l'immunité naturelle et qu'ils jouent un rôle majeur comme première barrière de défense (29–30).

Cependant une stimulation polyclonale incontrôlée des cellules auto-réactives normales entraîne une augmentation des aAcs au-delà d'un seuil tolérable (31-32) c'est les auto-anticorps **pathologiques** (dues a une perte de tolérance vis-à-vis des antigènes de soi) qui sont souvent de classe IgG, de forte affinité, entraînant des maladies auto-immunes.

Sachant que les auto-anticorps naturels et pathogènes sont produits par des clones B différents (33).

III.2/Intérêt clinique de la recherche des auto-anticorps (56-57):

- * Les auto-anticorps sont utilisés pour le **diagnostic** et la **classification** des maladies auto-immunes
- * La connaissance de ces auto-anticorps peut améliorer le **traitement** de la maladie.
- * **Le suivi** du taux d'auto-anticorps peut dans certains cas être corrélé a l'**évolution** de la maladie et a la gravite de l'état clinique du patient.
- * Les auto-anticorps peuvent être des **marqueurs précoces** d'une maladie à venir (il peut se passer des mois et des années avant l'apparition de signes cliniques).

III.3/ Les auto-anticorps utiles pour le diagnostic des MAI :

Les auto-anticorps les plus recherchés pour le diagnostic des MAI sont :

1. Les facteurs rhumatoïdes et les anti-citrullines en cas de polyarthrite débutante
2. Les anticorps antinucléaires en cas de suspicion de maladie auto-immune systémique
3. Les anticorps anti-tissu et anti-organe en cas de suspicion de maladie auto-immune spécifique d'organe
4. Les anti-phospholipides en cas de syndrome thrombotique ou de fausses couches répétées et inexplicables
5. Les anti-cytoplastes des polynucléaires neutrophiles (ANCA) en cas de vascularites systémiques(41).

IV/ L'apport de l'immunofluorescence indirecte dans l'exploration des maladies auto-immunes :

IV.1/ L'apport de IFI dans l'exploration des M.A.I.N.S.O :

IV.1.1/ Les auto-anticorps antinucléaires :

IV.1.1.1/ Définition :

Les auto-anticorps anti-nucléaires(AAN) regroupent les auto-anticorps dirigés contre les protéines participants à la structure et aux fonctions du noyau cellulaire. Ils sont principalement recherchés au cours des maladies systémiques appelées aussi connectivites, incluant le lupus érythémateux disséminé (LED) la polyarthrite rhumatoïde, la sclérodermie systémique ,le syndrome de Gougerot Sjögren, la connectivite mixte et les dermato polymyosites(34).

Ils sont classés comme suit (71) :

1-Anticorps dirigés contre l'acide nucléique (le matériel génétique) :

- ds-DNA(acide désoxyribonucléique - double brin).
- ss-DNA – simple brin.
- Nucléosome = la chromatine.

2-Anticorps dirigés contre les protéines associées à la chromatine :

- Histones.

3-Anticorps dirigés contre les protéines nucléaires solubles (ENA) :

- * Anticorps dirigés contre les protéines nucléoplasmiques :

-Sm (Smith nom du patient).

-RNP (Ribonucléoprotéine).

-SS- A=Ro(Robert= nom du patient).

-SS B =La (Lane= nom du patient).

-PCNA(Prolifilating Cell Nuclear Antigene).

-Mi2,Ku.

- * Anticorps dirigés contre les constituants des nucléoles :

-Scl70 Scleroderma 70.

-PM/Scl .

-Nucleoline.

-RNA- Polymerase I.

-NOR- 90.

-Fibrillarine.

4 -Anticorps dirigés contre les structures nucléaires :

- * Anticorps dirigés contre la membrane nucléaires :

-Lamines.

-Pores nucléaires.

- * Anticorps dirigés contre les structures dans le nucléoplasme :

-La matrice nucléaire.

-Centromères.

-Dots nucléaires.

5-Anticorps anti cellules mitotiques :

-NUMA ou MSA1.

-MSA2 (midbody).

-MSA3.

IV.1.1.2/ La recherche des auto-anticorps anti-nucléaires :

La recherche des AAN est habituellement faite en deux temps: après mise en évidence des anticorps antinucléaires totaux (dépistage), les spécificités sont caractérisées(détection)(35).

IV.1.1.2.1/Le dépistage :

La technique de référence pour le dépistage des anticorps antinucléaires est l'**immunofluorescence indirecte (IFI)** réalisée sur cellules HEP-2 et HEP-2000 (36).

IV.1.1.2.1.1/ L'IFI et anticorps antinucléaires :

IV.1.1.2.1.1.1/ Le substrat utilisé :

a .Auparavant :

Les coupes de tissus des rongeurs(foie de rat principalement) (34 ,38). Méthode globale de dépistage très sensible (95%), aujourd'hui rendue désuète devant son manque de spécificité et la généralisation des cultures.

b. Maintenant :

Comme le préconise la nomenclature des actes de biologie médicale depuis 1996 les AAN sont recherchés sur les cellules HEP-2 (Human Epithelial cell line type 2), dérivées d'une lignée tumorale de cellules épithéliales humaines, qui possèdent de gros noyaux et de gros nucléoles permettant une bonne visualisation des structures nucléaires reconnues par les anticorps du patient ; avec une expression suffisante de certaines antigènes (ex :centromère)

de plus, ces cellules étant tumorales, elles offrent l'avantage de présenter de multiples mitoses, utiles à l'interprétation et à l'identification d'anticorps particuliers(34,39).

Les cellules HEp 2000 ou cellules HEp transfectées par un gène codant pour la protéine SSA 60 KDa assurant ainsi une expression optimisée de l'antigène correspondant pour augmenter la sensibilité de la détection des anticorps anti- SSA (34,40).

Ce substrat est soit commercialisé soit préparé au niveau de laboratoire (voire Annexe IV).

c .Rappel sur la structure de la cellule HEp-2(41) :

Comme toutes les cellules eucaryotes, la cellule HEp-2 est organisée en plusieurs compartiments fonctionnels (figure7) :

- Le noyau
- Les réticulums endoplasmiques lisses.
- L'appareil de Golgi constitue par l'empilement déliements rubanées, séculaire ou tubulaire et par des vésicules de communication .
- Divers vésicules comme les lysosomes et les peroxyosomes.
- Le cytosol enfin ; milieu dans le quel organise le cytosquelette et dans le quel baignent tous les organites. il est limite par la membrane cellule et les ribosomes y sont libres soit opposes à la membrane nucléaire , il est en communication avec l'intérieur du noyau et ce qui sert à la traduction de l'ARN messenger en protéines en particulier des molécules telles que les aminoamacyl ARNt synthétase va y circuler librement.

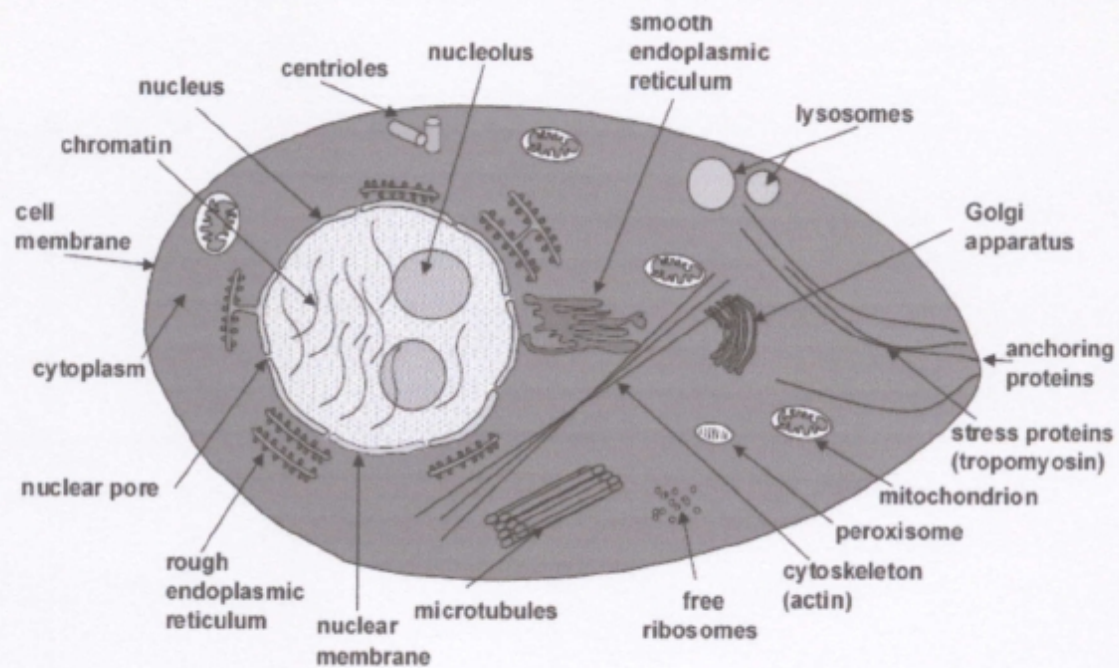


Figure 7 : La structure de la cellule HEp 2 en interphase (43).

d. Phases de la mitose(=division de la cellule)Rappel:

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent (42).

Le « cycle cellulaire» est essentiellement constitué de deux temps, l'interphase, au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles .En effet le cycle cellulaire est divisé en quatre phases, G1, S, G2, M. (Figure. 8)(42)

Au cours de cette division, il va y avoir une réorganisation des différents antigènes.

La chromatine va se condenser en chromosomes. Ces chromosomes sont constitués de 2 brins identiques reliés entre eux par un organe appelé centromère, ils vont migrer le long du fuseau mitotique vers le centre de la cellule mère ou ils vont se séparer en deux, entraînant la formation de 2 cellules filles.

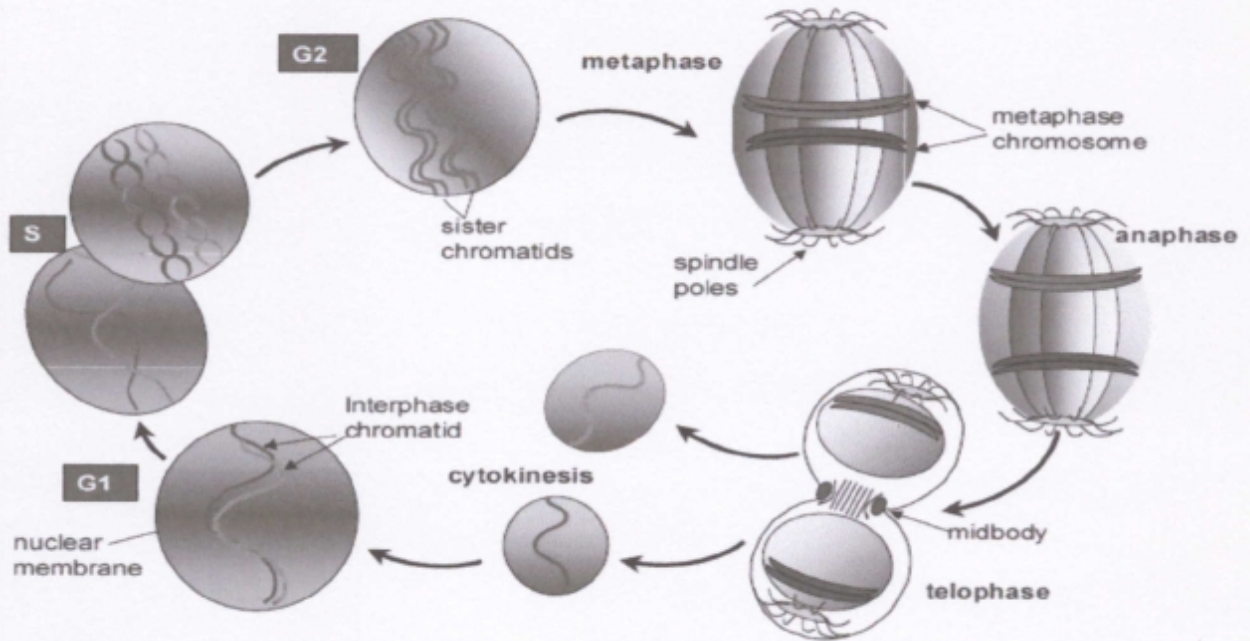


Figure 8 : La cellule HEp-2 aux stades de division (43)

IV.1.1.2.1.1.2/ Dilution :

En pratique, la plupart des laboratoires effectuent le dépistage des ANA chez l'adulte à une dilution du sérum au 1/80e ou au 1/160e. En effet, 10 à 15 % des sujets adultes apparemment sains ont des ANA à la dilution au 1/80e et 5 % au 1/160^e selon Adams (44), et cette fréquence augmente avec l'âge, principalement chez les femmes après 60 ans (43, 44). De tels titres sont à l'évidence sans valeur diagnostique.

Chez l'enfant, il est possible de faire le dépistage à une dilution moins forte bien que 9% des sujets sains soient positif au 1/40 et seulement 3% au 1/80 (45)

IV.1.1.2.1.1.3/ Choix de l'immunoglobuline :

Dans les connectivites et notamment dans le LED, la majorité des AAN sont des IgG (46), mais toutes les classes peuvent être observées. S'il n'existe pas de consensus pour la révélation des anticorps fixes, certains laboratoires utilisent comme antisérum conjugué à la FITC des anticorps anti-immunoglobuline polyvalents autres des anti- IgG humain. Soulignant

cependant que l'utilisation des anti- IgG humain peut parfois améliorer l'image de la fluorescence nucléaire (49).

IV.1.1.2.1.1.4/ La lecture et l'interprétation :

La lecture avec un microscope équipé en épifluorescence au grossissement minimum de 400 permet de déterminer l'aspect et le titre de l'anticorps correspondant à l'inverse de la plus forte dilution du sérum donnant encore une fluorescence nucléaire (51).

Une meilleure identification de l'aspect peut être obtenue par une observation à l'immersion.

Classiquement on notera l'aspect en fluorescence des cellules au repos ainsi qu'en mitose cet aspect peut être :

- ✓ Homogène
- ✓ Périphérique
- ✓ Moucheté
- ✓ Nucléolaire.

La plupart des antigènes nucléaires sont réparties de manière uniforme dans le noyau des cellules au repos. Par contre les antigènes nucléaires présentent une distribution particulière lors de la condensation de la chromatine en chromosomes, au moment de la mitose.

Des lors, ce sont les cellules en mitose qui vont permettre de préciser avec exactitude l'aspect en fluorescence rendant la lecture au microscope moins subjective. En effet chaque type de fluorescence est un indicateur de la spécificité des anticorps détectés.

Pour interpréter les AAN ; il est nécessaire de tenir compte de la clinique, d'un éventuel traitement, mais également du sexe et de l'âge du patient ; la fréquence des AAN augmente avec l'âge ; plus particulièrement chez les femmes(24). Si les AAN sont principalement retrouvés dans les maladies auto-immunes systémiques, ils peuvent être également observés au cours d'infections, de néoplasies, d'hépatopathies et lors de la prise de certains médicaments(34) .

IV.1.1.2.1.1.4.1/Auto-anticorps à localisation nucléaire : facteur antinucléaire(FAN) (34) :

a .Aspect homogène :

a.1. Avec cellules en mitose positives :

Cet aspect est défini par une fluorescence uniforme des noyaux de toutes les cellules avec parfois une accentuation périnucléolaire. Les noyaux des cellules en mitose sont plus fortement marqués. Parfois une fluorescence plus intense peut être observée à la périphérie du noyau, formant un renforcement fréquemment associé à un titre élevé en anti-ADN(34)

- **Antigènes :**

Cet aspect s'observe principalement avec les anticorps dirigés contre l'acide désoxyribonucléique (ADN) et contre les protéines associées à la chromatine (voire le diagramme) : anticorps anti-histones et anti-nucléosomes (*figure 9*). Les anti/corps anti-ADN topoisomerase I (anti-Scl-70) donnent une image en (verre dépoli) des cellules en interphase(34)(figure10)

- **Association clinique :**

Ces aspects de fluorescence homogène peuvent très retrouvés au cours du lupus érythémateux disséminé, du lupus médicamenteux (ou iatrogènes) et de la polyarthrite rhumatoïde et dans la sclérodermie(34).

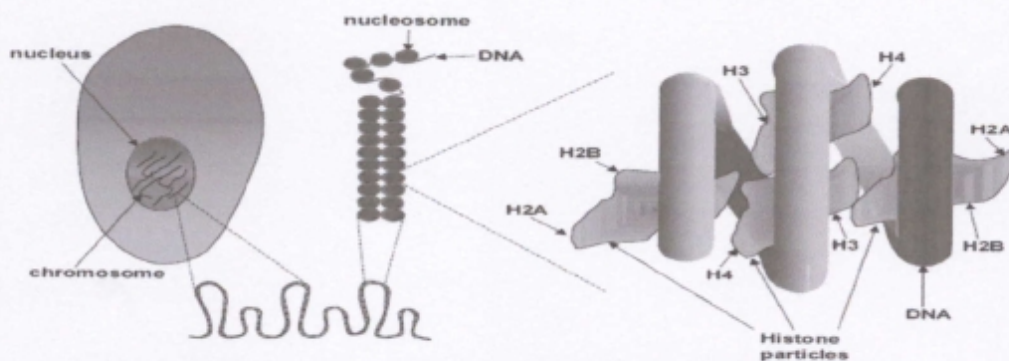


Diagramme N°01 des Histones associés à l'ADN(47).

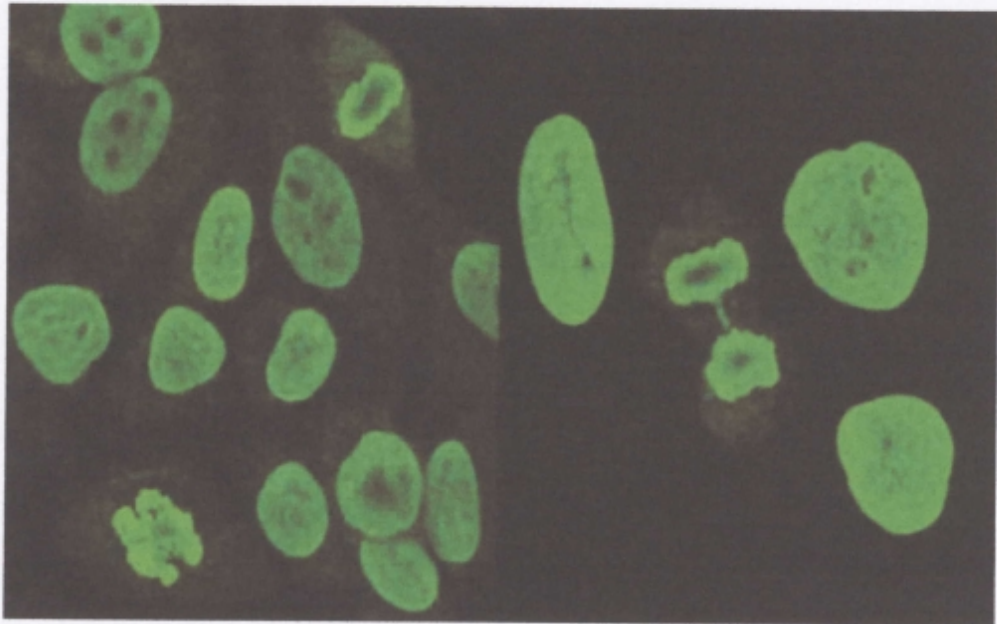


Figure 9 : Aspect_antinucéaire de type homogène(47).

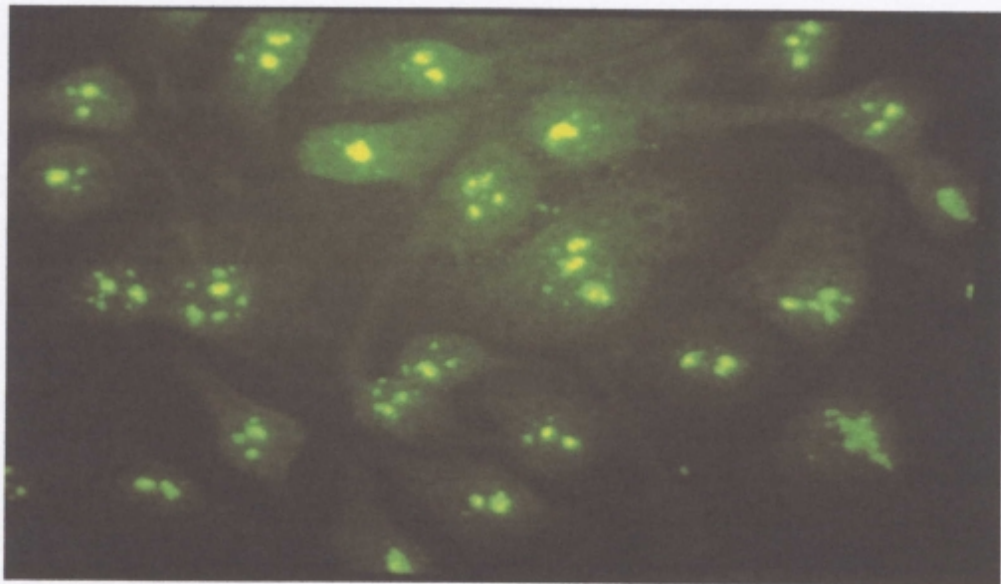


Figure 10 : L'aspect est de type homogène, anti-nucléolaire (50).

a.2/ Avec cellules en mitose négatives :

➤ Aspect A :

Les AAN peuvent avoir pour cible la membrane nucléaire : le noyau des cellules en interphase montre alors une fluorescence homogène et translucide avec un fin marquage continu périnucléaire et parfois des images en (coups d'ongles) correspondant aux replis membranaires (figure 11)(34).

• Antigènes:

Cet aspect peut traduire la présence d'anticorps anti-lamines (A, B ou C), d'anti-récepteur de la lamine B ou d'anti-LAP (lamina-associated polypeptides)(34).

• Association clinique:

Ces anticorps peuvent être retrouvés dans le lupus, le syndrome des anti-phospholipides et au cours d'hépatopathies(34).

➤ Aspect B:

Une fluorescence granitée des noyaux des cellules en interphase avec un marquage discontinu périnucléaire (figure 12)(34).

• Antigènes :

Cette fluorescence est observée en présence d'anticorps qui reconnaissent des glycoprotéines localisées au niveau des pores nucléaires, anti-gp210, anti-gp62(34) (voir diagramme).

• Association clinique :

Ces anticorps sont retrouvés dans la cirrhose biliaire primitive (CBP)(43).

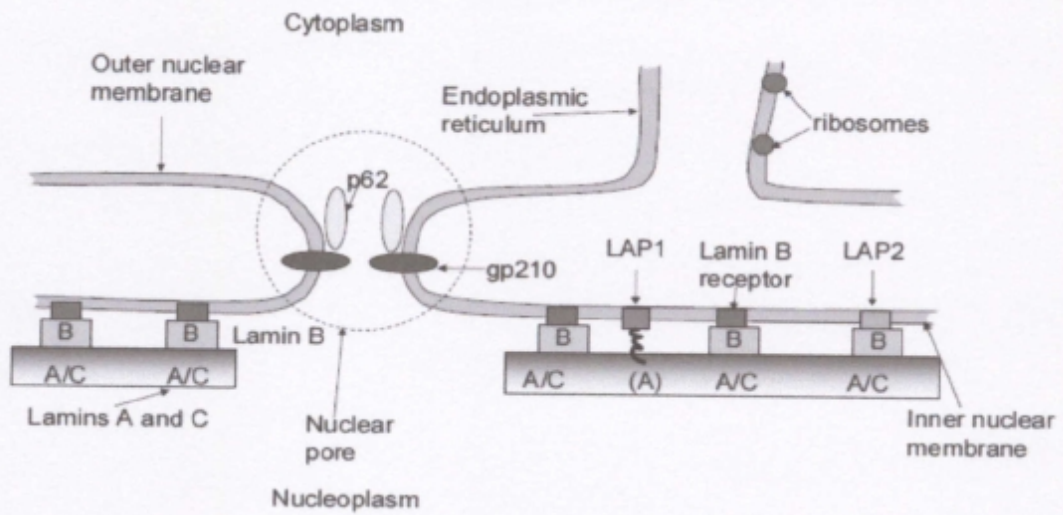


Diagramme N° 02 de la membrane et des complexes des pores nucléaires (47)..

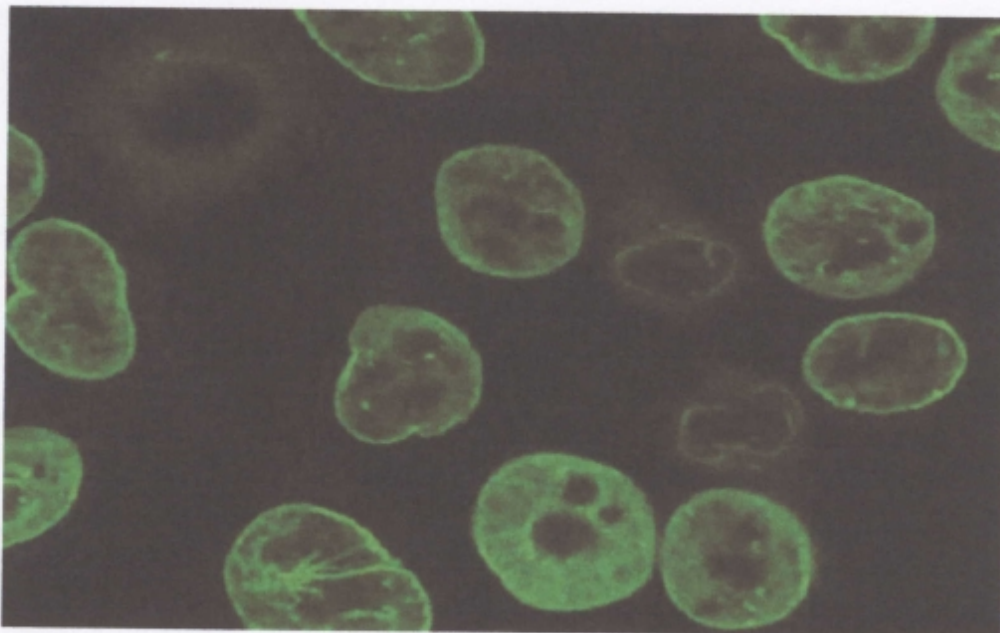


Figure 11 : Aspect de la membrane nucléaire sur cellules Hep-2 (47).

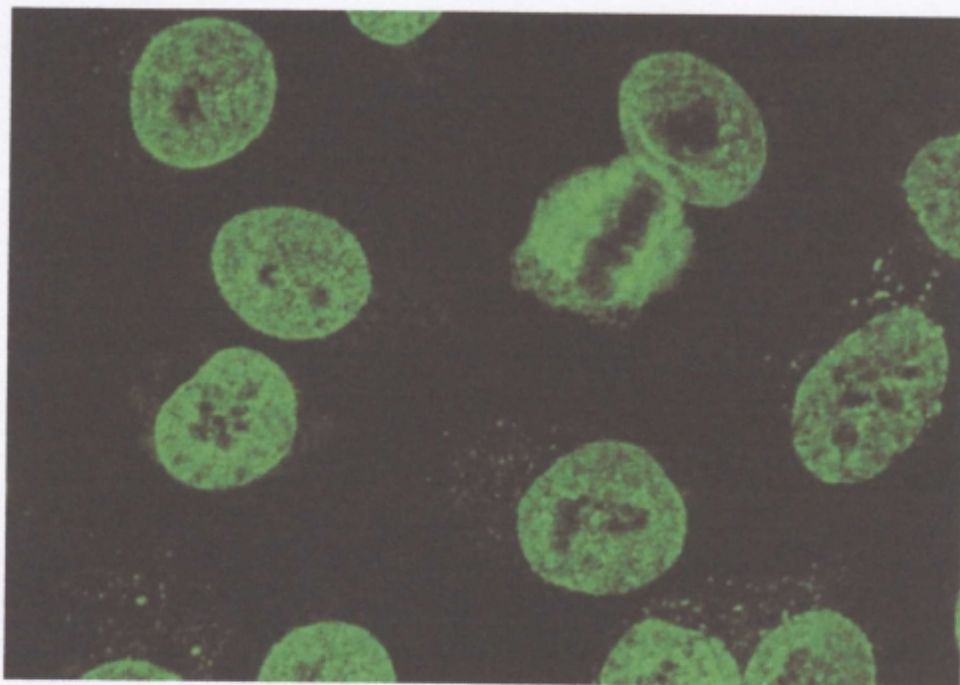


Figure 12:Aspect des pores nucléaires (Anti-GP210) (47).

b. Aspects mouchetés :

De nombreux anticorps reconnaissant des antigènes nucléo-plasmiques solubles dans des tampons salins donnent des images nucléaires mouchetées(34) (Annexe V).

b.1/ Aspect moucheté à grains irréguliers :

Les cellules en interphase présentent dans leur noyau de gros grains irréguliers fluorescents mais les nucléoles et les noyaux des cellules en mitose sont négatifs (34) (figure 13).

- **Antigènes :**

Cet aspect évoque la présence d'anticorps anti-snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) principalement les anticorps anti-U1 snRNP (figure 14) appelés également anti-RNP(34).

Des images similaires sont observées avec les anticorps anti-Sm qui reconnaissent des polypeptides associés aux complexes U1 -U6 snRNP(34).

- **Association clinique :**

Les anticorps anti-snRNP sont des marqueurs du syndrome de Sharp (connectivite mixte), et retrouvés également dans le lupus.

Par contre les anticorps anti-Sm sont retrouvés exclusivement dans le LED (10 a 35 % des patients);comme ils peuvent être associés aux anticorps anti-RNP .

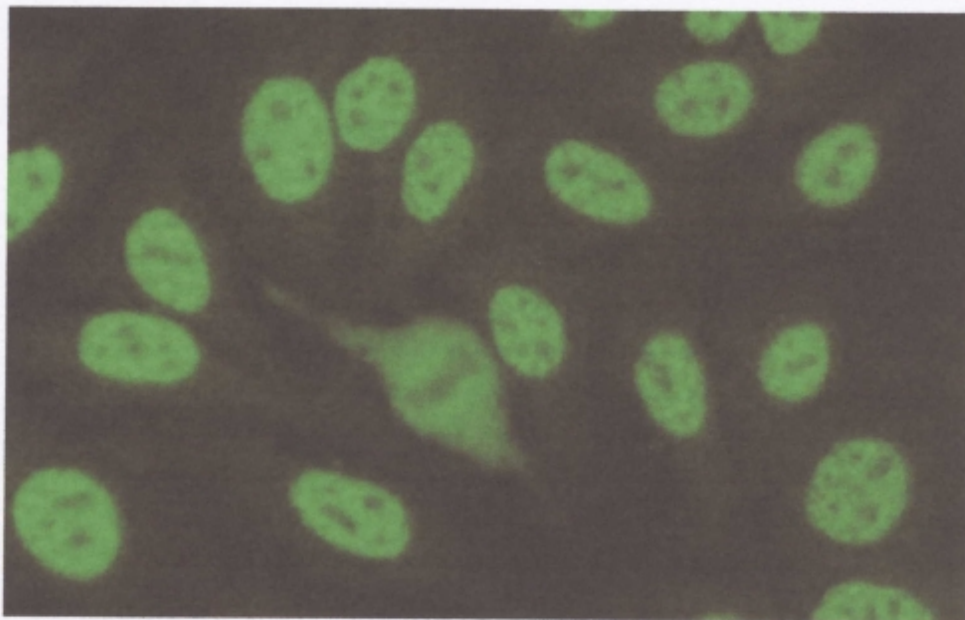


Figure 13 :Aspect anti-nucléaire de type moucheté à grains irréguliers(50).

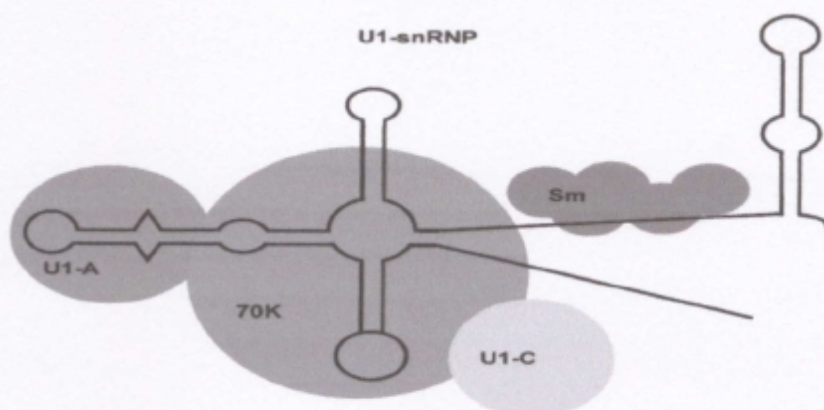


Diagramme N° 03 de l'antigène Sm et le complexe U1 -sn RNP (50) .

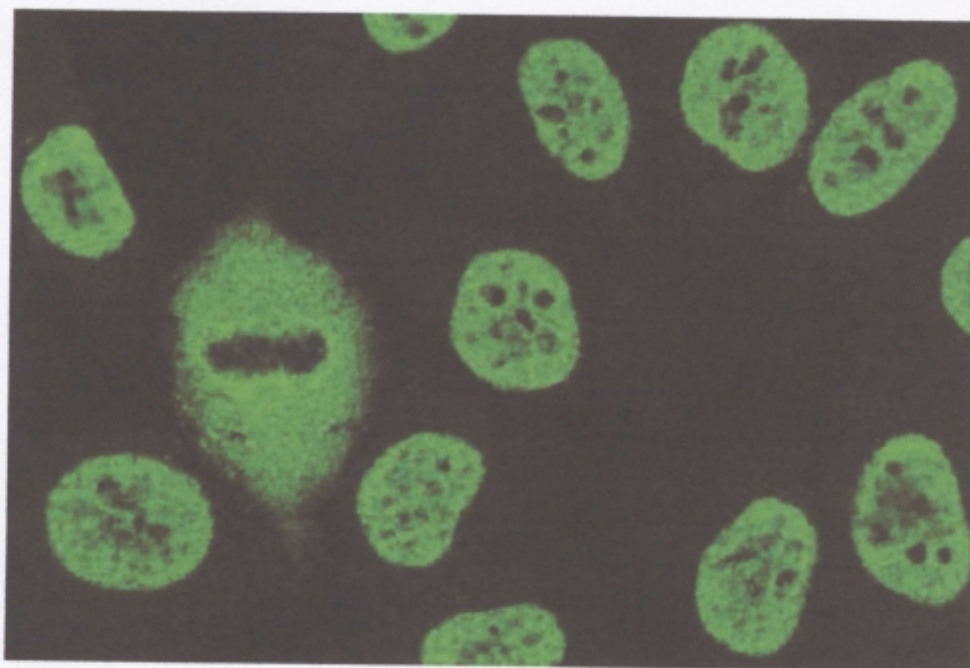


Figure 14: Aspect des auto-anticorps anti Sm et /ou anti U1- Sn RNP sur HEp- 2 (50)

b.2 Moucheté fin et dense

➤ Aspect A :

Il s'agit d'une fluorescence mouchetée avec des grains fins réguliers dans les noyaux des cellules en interphase, les nucléoles sont négatifs de même que le noyau des cellules en mitose. En fonction de la préparation, une légère fluorescence cytoplasmique mouchetée peut être observée (figure 15).

Sur les cellules HEp-2000 10 à 15% des cellules surexpriment l'antigène SSA de 60 kDa et donnent une fluorescence nucléolaire, les autres cellules (+/-85%) sont finement mouchetées (figure 17) (34).

• Antigènes :

Il correspond à l'antigène SSA constitué de deux ribonucléoprotéines de 60 kDa et 52 kDa, qui est souvent associé aux anticorps anti SSB au cours du syndrome de Gougerot-Sjögren et parfois dans le Lupus (34).

- **Association clinique :**

Au cours du LED et du syndrome de Gougerot-Sjogren, les anticorps anti-SSA 60 kDa sont retrouvés isolément ou associés aux anti-SSA 52 kDa. Ces derniers peuvent être également détectés dans les polymyosites associées aux anticorps anti-Jo1 (40).

- **Aspect B :**

Un aspect moucheté nucléaire dense avec parfois une légère fluorescence homogène des nucléoles(34) (figure 17).

- **Antigène :**

Cet aspect évoque la présence d'anticorps anti-SSB ou La coexiste fréquemment avec les anticorps anti-SSA(34).

- **Association clinique :**

Les anticorps anti-SSB sont fréquents(80%) dans le syndrome de Gougerot-Sjogren et retrouvés aussi dans le lupus LED (10%)et la sclérodémie (5%)(34).

NB :

Une fluorescence finement granulaire, plus ou moins dense, dans les cellules en interphase peut être due également à la présence d'anticorps **rare**s tels que les anticorps anti-Mi2 présents dans la dermatomyosite, les anticorps anti-SL associés au LED ou les anticorps anti- Ku décrits dans le LED et les syndromes de chevauchement polymyosite/sclérodémie(34).

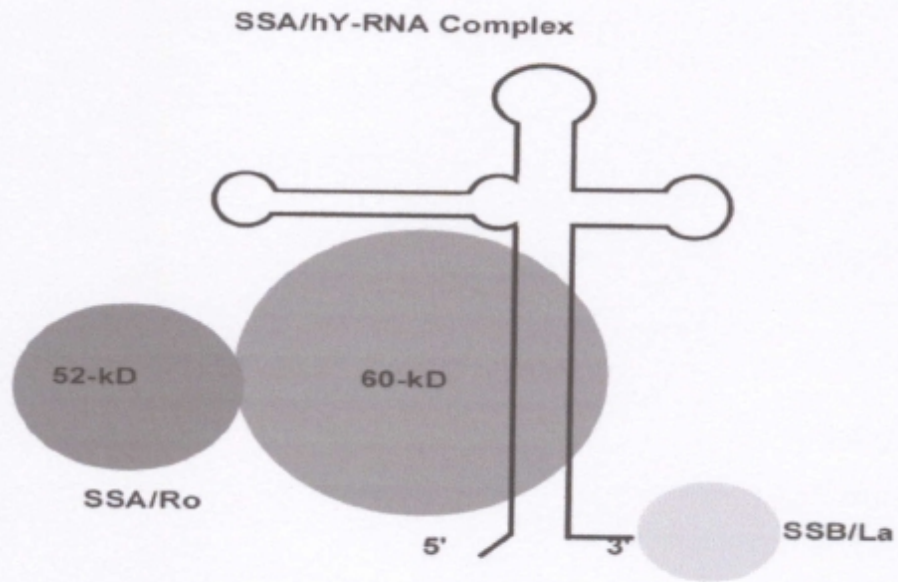


Diagramme N° 04 du complexe SS-A/SS-B (50).

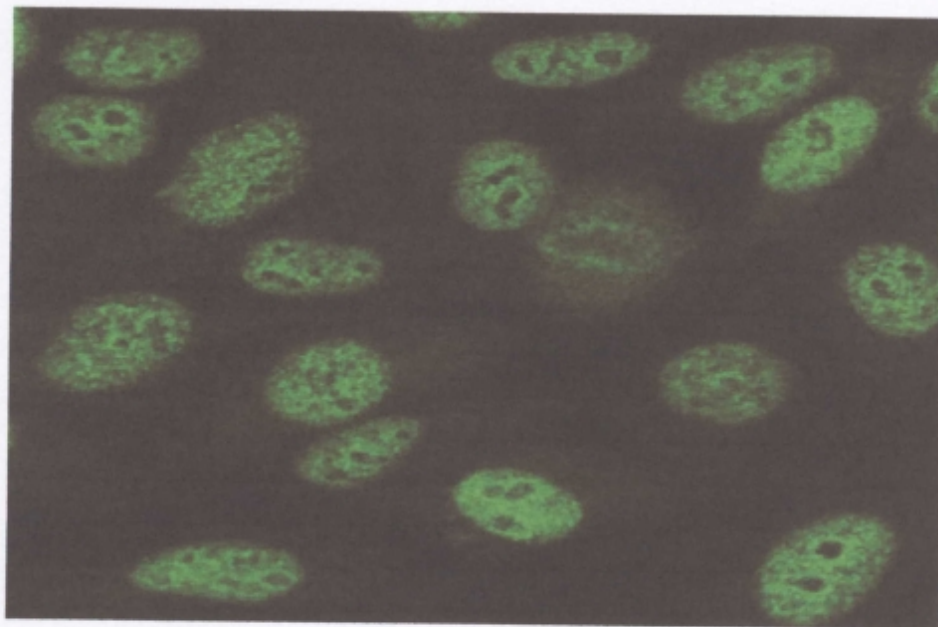


Figure 15 : Aspect typique des SS-A /RO sur cellules HEP-2 standard (50).

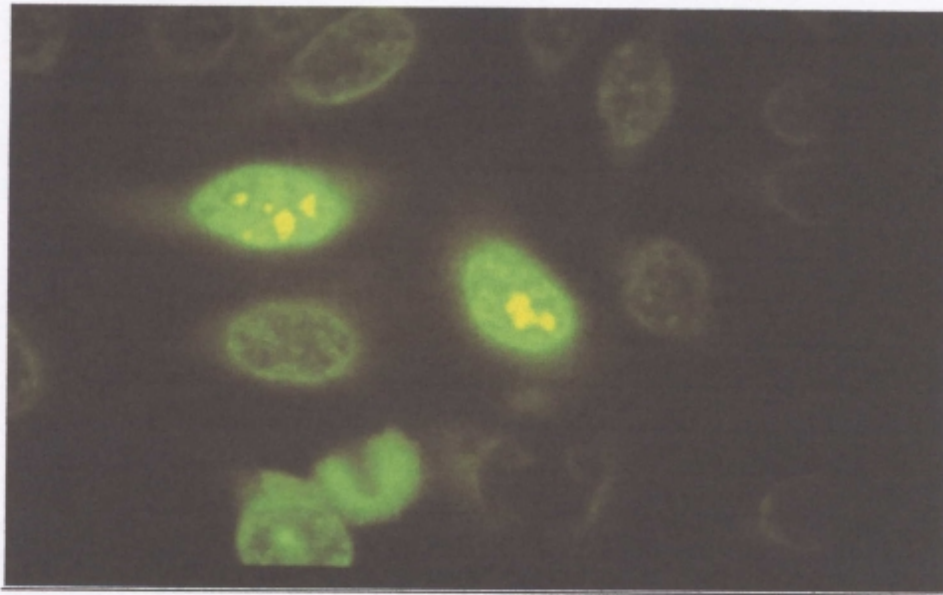


Figure 16 : Aspect typique des SS-A /RO sur cellules HEp-2 transfectées(Hep-2000). (50)

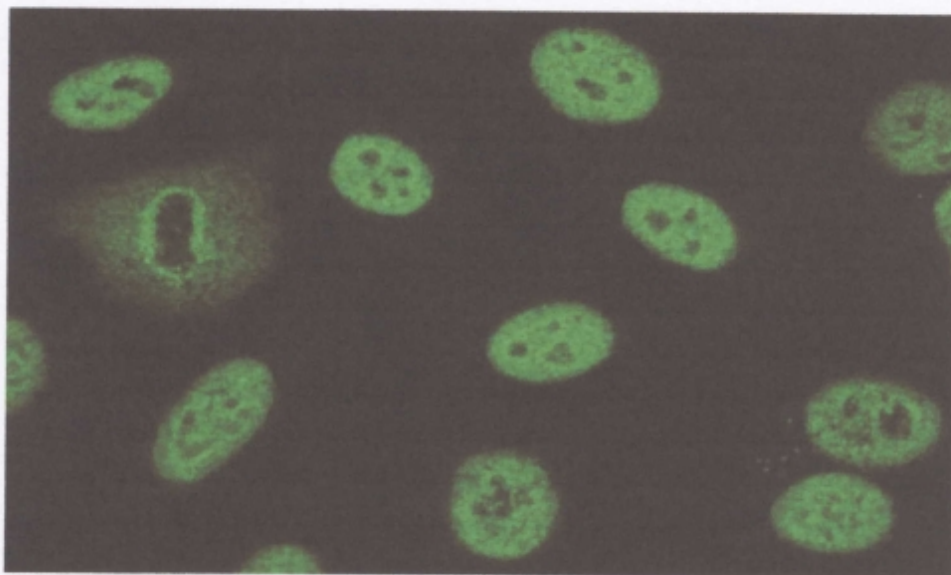


Figure 17: Aspect des auto-anticorps anti SSB/La sur HEp-2(50)

b.3. Moucheté pléomorphique :

- **Aspect :**

Une fluorescence mouchetée irrégulière dont l'intensité est variable entre les cellules peut s'observer dans 30 à 50 % des cellules en interphase (phase S)(34)(figure 18).

- **Antigène :**

Cette image évoque la présence d'anticorps anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) dont la cible est une protéine auxiliaire de l'ADN polymérase δ (delta)(34).

- **Association clinique :**

Ces anticorps rares sont retrouvés uniquement dans le LED mais seulement dans 1 à 3 % des cas (34).

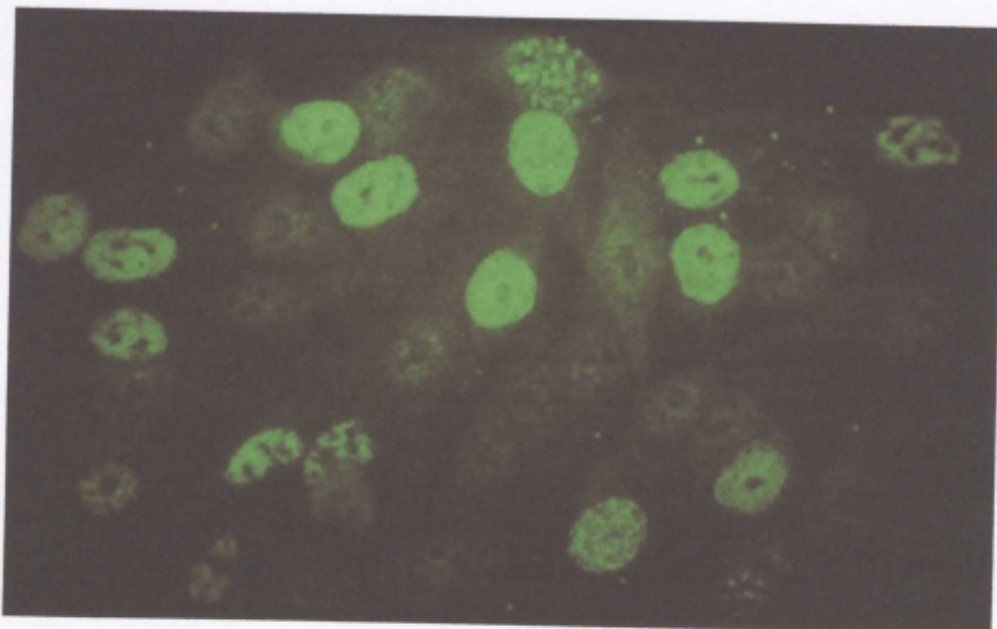


Figure 18: Aspect des anti-PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) sur cellules HEp-2(47)

b.4/Moucheté ponctué :

➤ Aspect A :

On note la présence d'une quarantaine de grains fluorescents isolés et réguliers, bien répartis dans le noyau des cellules en interphase mais regroupés dans les cellules en division au niveau de la plaque équatoriale (métaphase) ou le long du fuseau mitotique (anaphase) (figure 19)(34).

• Antigène :

Cet aspect de fluorescence est caractéristique et suffit à affirmer la présence d'anticorps anti-centromères. Ces anticorps reconnaissent des protéines présentes sur le kinétochore, souvent le CENT-B (80 KDa) parfois CENT-A(17 KDa) et CENT-C(140KDa) (34) .

• Association clinique :

Les anticorps anti-centromères sont retrouvés le plus souvent lors de sclerodermies limitées, du syndrome CREST (calcifications, syndrome de Raynaud, atteinte oesophagienne, sclerodactylie, telangiectasies) et parfois dans la cirrhose biliaire primitive(34).

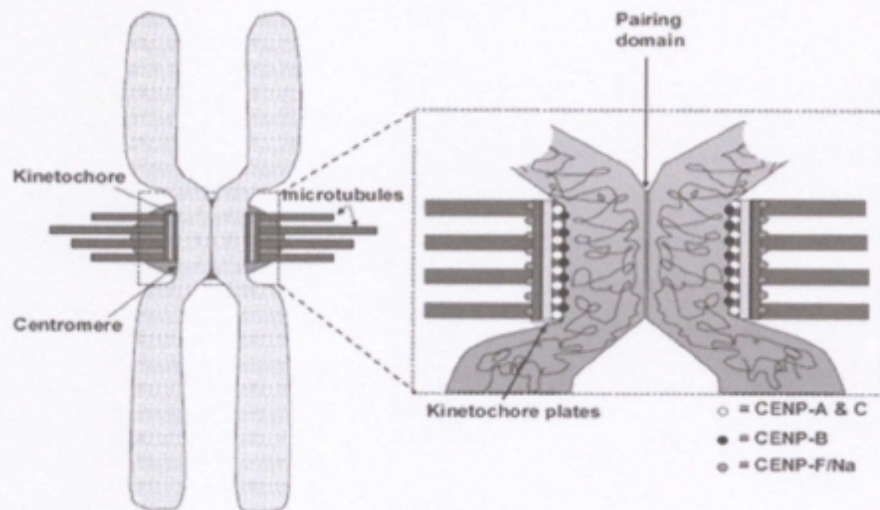


Diagramme N° 05 : montrant la localisation des protéines du centromere. la localisation du CENP-D est mal défini.

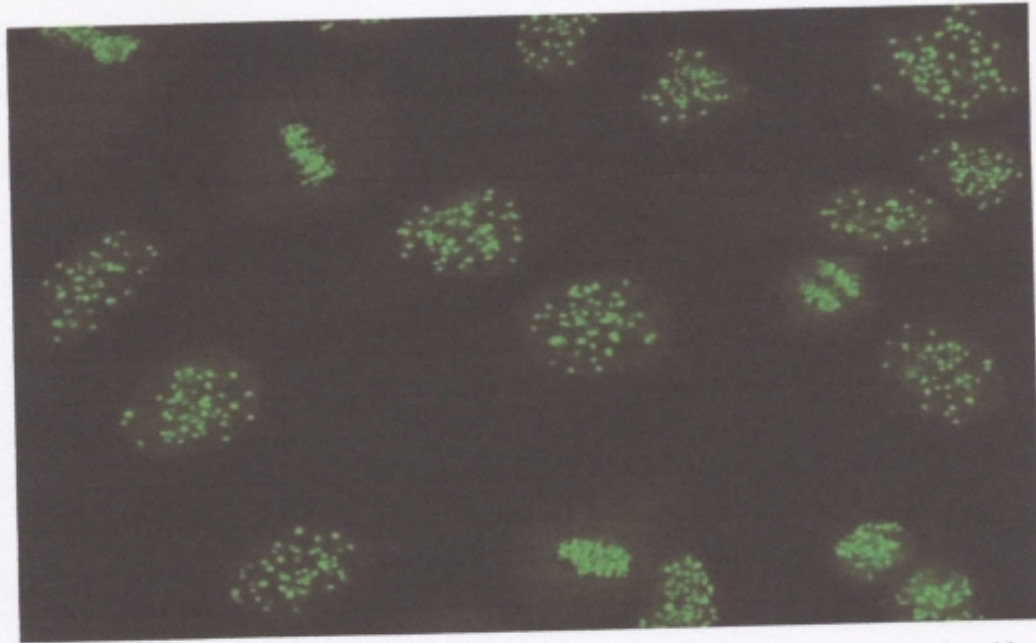


Figure 19 : Aspect des auto-anticorps anti-Centromère sur cellules Hep-2(47).

➤ **Aspect D :**

Un autre aspect ponctue peut également s'observer avec la présence de deux à une vingtaine de points fluorescents dispersés dans le noyau des cellules en interphase, mais absents des cellules en métaphase(34) (figure 20).

• **Antigène :**

Cet aspect appelé " dots nucléaires ", est donné par des anticorps reconnaissant les corps spirales (coilin p80) ou des corps nucléaires (Sp100) dont la fonction est male connue(34).

• **Association clinique :**

Ce rare aspect est retrouve dans 6% de la cirrhose biliaire primitive parfois dans le syndrome de Sjögren et rarement au cours du LED (47).

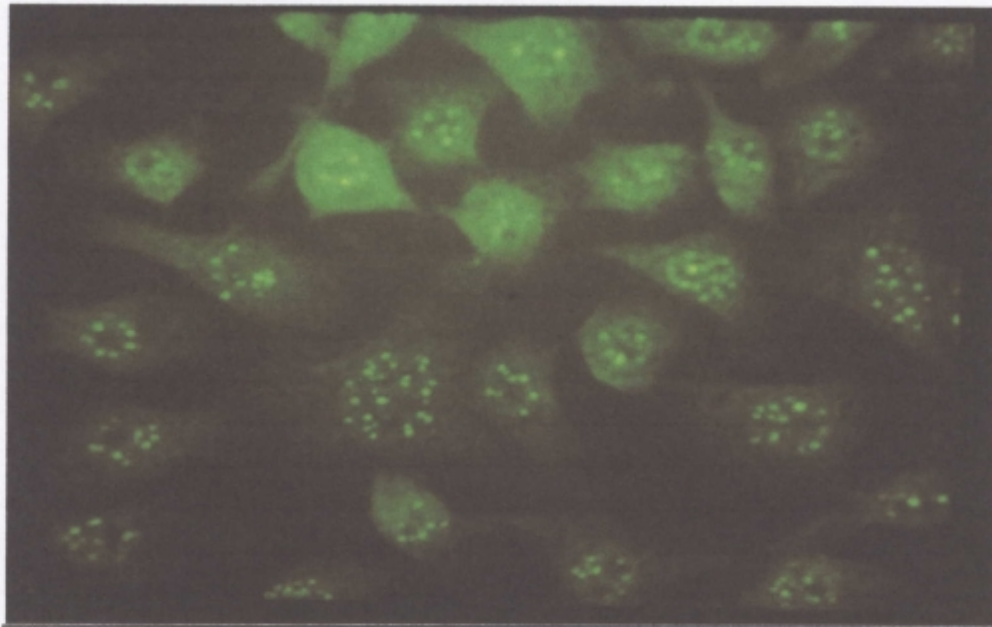


Figure 20 : Aspect des Dots nucléaires sur cellules Hep-2 (47).

IV.1.1.2.1.1.4.2/Images nucléolaires :

➤ Aspects et anticorps associées:

Le noyau des cellules HEp-2 contient 1 à 5 gros nucléoles dont la fonction principale est d'apporter à la cellule les ribosomes, un élément indispensable à la synthèse protéique (55). En fonction des cibles reconnues par les anticorps (Annexe VI) trois types de fluorescences nucléolaires peuvent être distingués :

Tout d'abord, le nucléole peut apparaître **homogène** de façon isolée (Ac anti-Th/To et anti-B23/nucléophosmine), ou couplé avec une fluorescence mouchetée du noyau (anti-PM/Sci, anti-Sci70) (34)(Figure 21).

Ensuite, l'aspect du nucléole peut être **moucheté** et formé soit de grains fins et centrés s'il s'agit d'Ac anti-ARNP-I(Figure 22), soit de gros grains regroupés au centre s'il s'agit d'Ac anti-fibrillarine et/ou d'Ac anti-U3(34)(Figure 23).

Enfin, la mise en évidence de deux à cinq gros spots ou « **dots** » dans la zone claire du nucléole est caractéristique des Ac anti-NOR90(34)(Figure 24).

Notons que lorsque la cellule est en mitose, le nucléole disparaît et la fixation des AANuc peut s'observer au niveau de la plaque équatoriale de la chromatine en division.

- **Associations cliniques :**

Ces anticorps anti-nucléoles sont retrouvés essentiellement dans les sclérodermies, parfois dans le lupus(34).

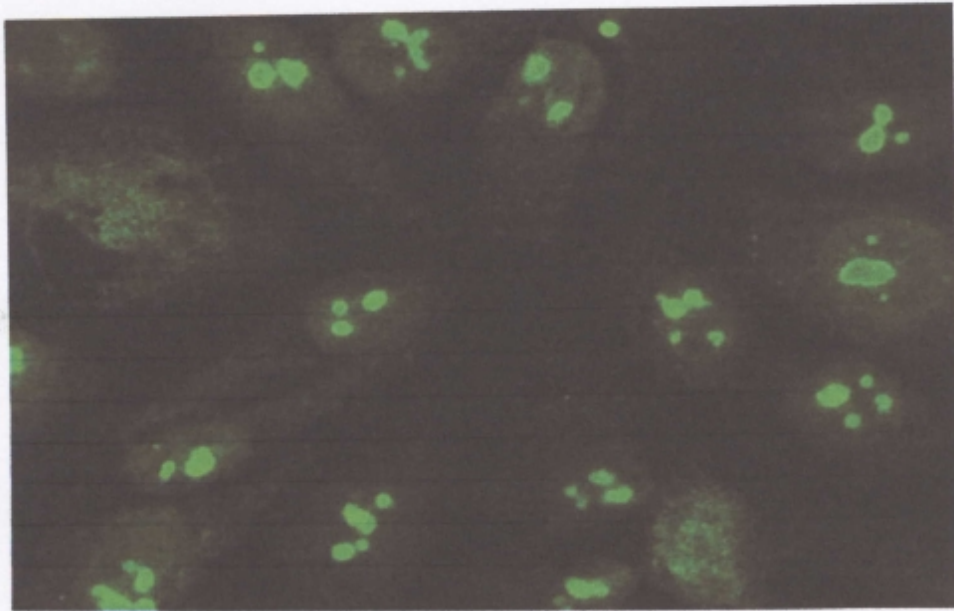


Figure 21:Aspect homogène du nucléole associé à une fluorescence mouchetée du noyau (anti-PM/Sci, anti-Sci)(47).

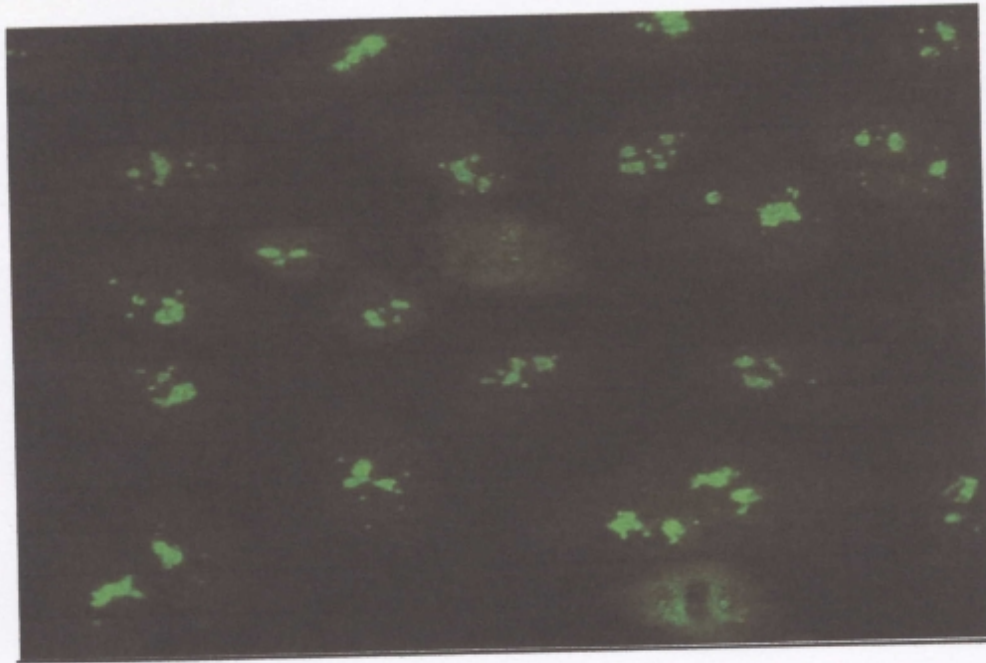


Figure 22 : Aspect moucheté nucléole (Anti ARN polymérase-1) [Nucleolar speckled pattern (47).

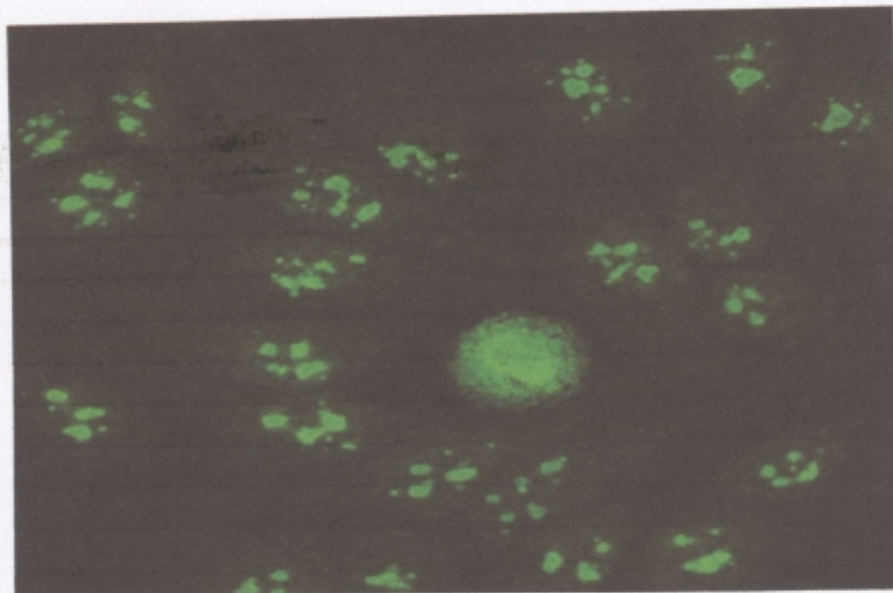


Figure 23 : Aspect moucheté du nucléole (Nucleolar clumpy) [AC anti-fibrilline et/ou anti-U3](47).

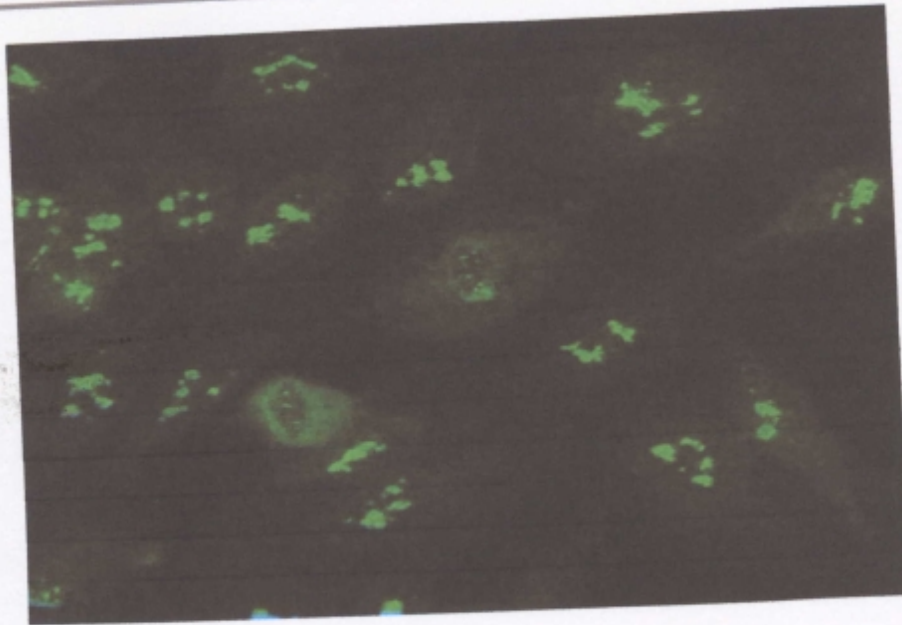


Figure 24 : Aspect des Dots nucléolaires (NOR 90) (47).

IV.1.1.2.1.1.4.3/ Fluorescence associée à l'appareil mitotique :

Certains anticorps, rares, reconnaissent des antigènes exprimés uniquement dans les cellules en mitose.

a. Anticorps anti-centrioles ou anti-centrosomes :

Dans les cellules en métaphase, la fluorescence est localisée en deux points identiques, symétriques, à chaque pôle du fuseau mitotique.

Dans les cellules en interfase, un ou deux points fluorescents proches de la membrane nucléaire sont visibles (34) (figure 25).

Pour ces anticorps plusieurs cibles ont été identifiées, l'enolase, la pericentrine, le PCM-1 (pericentriolar material 1) et Cep250 (56).

Ces anticorps anti-centrioles ont été décrits dans des syndromes de Raynaud, des syndromes sclérodermiques, et au cours d'ataxies post-varicelle (57)

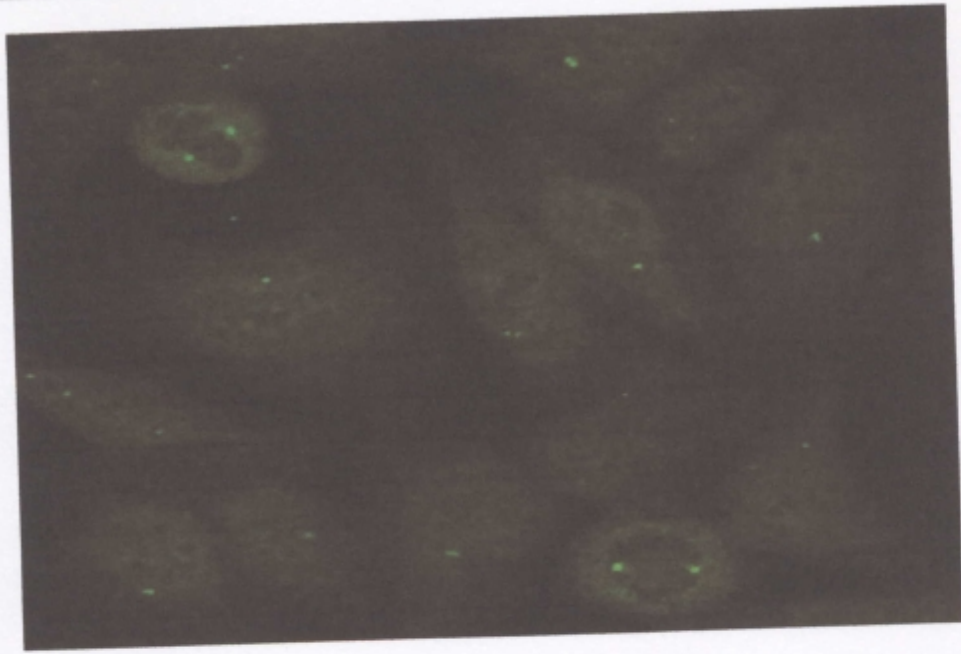


Figure 25 :Aspect des auto-anticorps anti- centriole sur cellules Hep-2 pattern(47).

b. Anticorps anti-fuseau mitotique :

Plusieurs anticorps reconnaissent des proteines associees à l'appareil mitotique.

b.1/Anti-MSA-1 (mitotic spindle apparatus) :

Les anti-MSA-1 appelés également NuMA-1(nuclear mitotic apparatus) donnent une fluorescence aux extrémités du fuseau mitotique " en accent circonflexe " et marquent les centrosomes dans les cellules en métaphase et en anaphase. Une image finement mouchetée est observée dans les cellules en interphase (figure 26).

En immunoblot, ces auto-anticorps reconnaissent une protéine de 240 kDa impliquée dans la réorganisation post-mitotique du noyau(34).

Associations cliniques :

Association mal connue et non spécifique , mais il est observé dans le SLE ; le syndrome de Sjôgren, MCTD et la polyarthrite(47).

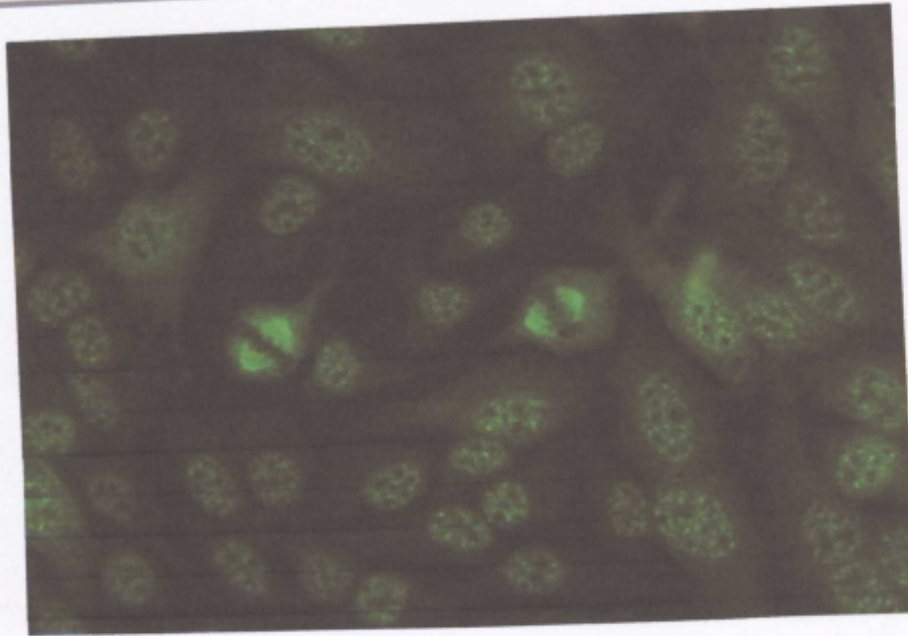


Figure 26: Aspect des anti-NuMA1 sur cellules HEp-2 (47).

b.2/Anti-midbody ou anti-MSA2:

L'anticorps anti-NuMA-2, reconnaissant en immunoprécipitation une protéine de la famille des kinésines HsEg5, présente une fluorescence du fuseau et des centrosomes durant la métaphase et l'anaphase alors que les cellules en interphase sont négatives. A la télophase, les ponts intercellulaires entre deux cellules filles, appelés " midbody " sont visibles(34).

Ces anticorps anti-NuMA2, peu fréquents, ont été décrits dans le LED, le syndrome de Gougerot-Sjogren, et des polyarthrites (58).

Les anticorps anti-MSA-2 donnent une fluorescence au niveau du midbody des cellules en télophase ainsi qu'une fluorescence mouchetée dans les autres cellules en division (figure 27). Ces anticorps rares, reconnaissant une protéine qui se lie au centromère CENP-E,

- **Associations cliniques :**

Aspect rare retrouvé décrit au cours de sclérodermies systémiques et de syndromes de Raynaud (59).

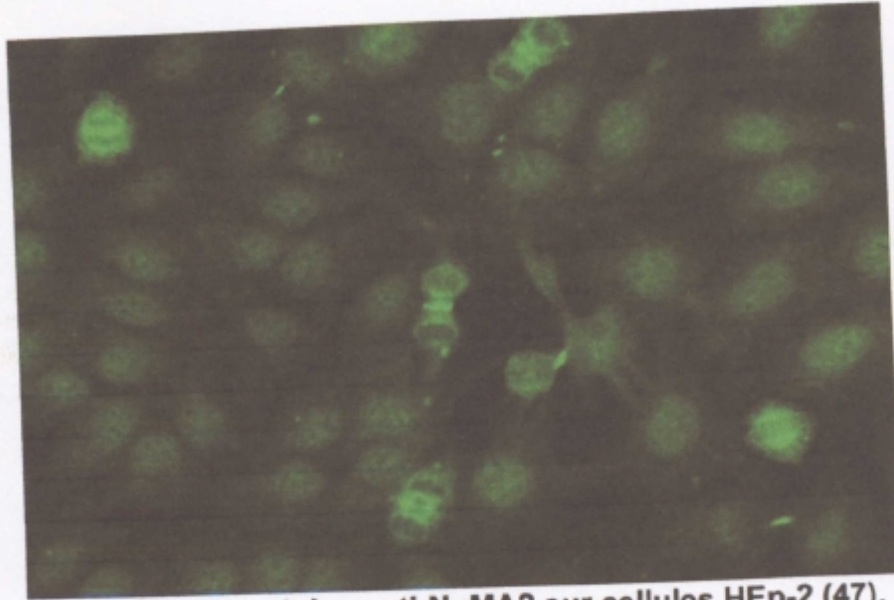


Figure27: Aspect des anti-NuMA2 sur cellules HEp-2 (47).

b.3/Anti-MSA-3

Les anticorps anti-MSA-3 présentent des granulations fluorescentes perichromatiniennes dans les cellules en métaphase et un aspect finement moucheté dans quelques cellules en interphase (figure 28). Ces anticorps reconnaissent la protéine CEN P-F,

- **Associations cliniques :**

Ces aAcs ont été observés chez quelques patients présentant une néoplasie respiratoire (60)

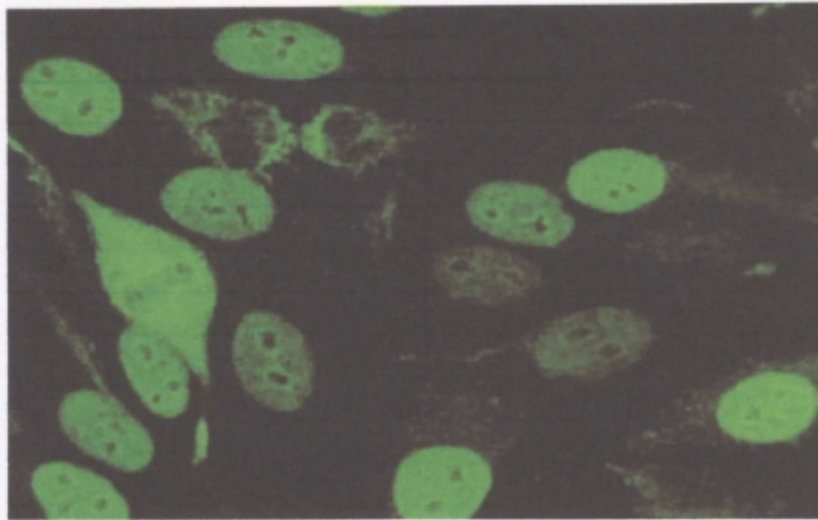


Figure28 :Aspect des anti-NuMA 3 sur cellules HEp-2 (47)

IV.1.1.2.1.3/Autres techniques de dépistage :

Des tests fondés sur la technique **Elisa** (37) et du **Dot Blot** ont été développés afin d'automatiser la recherche des ANA, mais leur généralisation n'a pas été possible par manque de spécificité dû à la nature des extraits antigéniques utilisés (35).

IV.1.1.2.2/L'identification des AAN :

Dans certains cas, l'aspect de la fluorescence nucléaire est suffisamment évocateur pour que l'on puisse en déduire la structure nucléaire reconnue par l'Ac : Ac anti-centromères, Ac anti-membrane nucléaire, Ac anti-nucléoles, aAcs nucléaires de type nuclear dots.

Dans d'autres cas, l'aspect de la fluorescence nécessite une identification des ANA dépistés (64)

A-Anticorps anti-ADN natif :(voire les auto-anticorps anti-ADN natif)

B- Anticorps anti-histones :

Des techniques **immunoenzymatiques** de type **Elisa**, utilisant comme substrat antigénique des fractions d'histones purifiées, sont utilisées.

C-Anticorps spécifiques d'antigènes nucléaires solubles ENA :

Après immunofluorescence indirecte sur cellules Hep2, on peut rechercher les anticorps anti-antigènes solubles par les méthodes suivantes :

- L'immunodiffusion double en gélose et la contre-immunoelectrophorèse .
- Les méthodes immunoenzymatiques de type Elisa .
- L'immuno-dot.
- L'hémagglutination passive .
- L'immuno-blot .

IV.1.1.2.1.1.4.2/Auto-anticorps à localisation cytoplasmique :

L'observation d'une fluorescence cytoplasmique lors de la recherche ANA par IFI sur cellules HEp-2 est loin d'être exceptionnelle. Dès l'instant où une fluorescence cytoplasmique est considérée comme significative, ne relevant pas du simple bruit de fond, son interprétation tiendra compte d'une part de son titre et d'autre part de son aspect qui, pour la clarté de l'analyse, sera classée en deux grandes familles : les marquages **linéaires** ou **filamenteux** et les marquages **granulaires** (65).

IV.1.1.2.1.1.4.2 .1/ Les auto-anticorps donnant une fluorescence linéaire :

On les observe sur les cellules en interphase et ce sont des auto-anticorps dirigés contre des composants du cytosquelette de la cellule.

a- Aspect en «cordages rectilignes» et parallèles traversant la cellule :

Cet aspect correspond au marquage des microfilaments (5 nm) qui sont repartis en faisceaux parallèles à la face interne de la membrane cellulaire et constitués principalement d'actine associée à diverses autres molécules telles que notamment la myosine (65) (**figure 29**).

- **Antigène :**

Cet aspect évoque donc fortement la présence d'aAc anti-actine polymérisée. mais on ne peut exclure que la cible soit en fait l'une des molécules associées(65).

- **Associations cliniques :**

Hépatites auto-immunes de type I (85%), chevauchement avec la cirrhose biliaire primitive (22%)et certaines hépatites médicamenteuses (65).

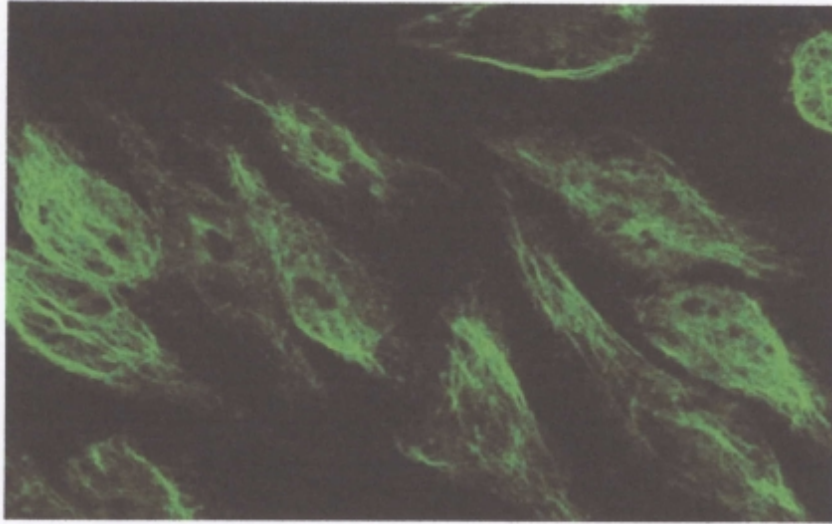


Figure 29 : fluorescence linéaire rectiligne traversant la cellule des Acs anti-microfilaments (47).

b- Aspect de filaments contournés :

• **Antigènes :**

Cet aspect correspond au marquage de deux variétés de fibres : les microtubules (20 nm) composés de tubuline associée à des protéines accessoires (figure 30), et les filaments intermédiaires (10 nm) que l'on peut subdiviser en au moins cinq variétés diversement représentées dans les différentes cellules et à la composition desquels participent une cinquantaine de protéines dont la desmine et la vimentine (65) (figure 30).

• **Associations cliniques :**

Les divers aAcs correspondant à ces aspects et à ces fibres sont observés dans des contextes cliniques très divers et n'ont pas vraiment d'intérêt clinique bien établi. Pour cette raison, les divers artifices facilitant la distinction des deux types de fibres ne sont pas utilisés en routine(65).

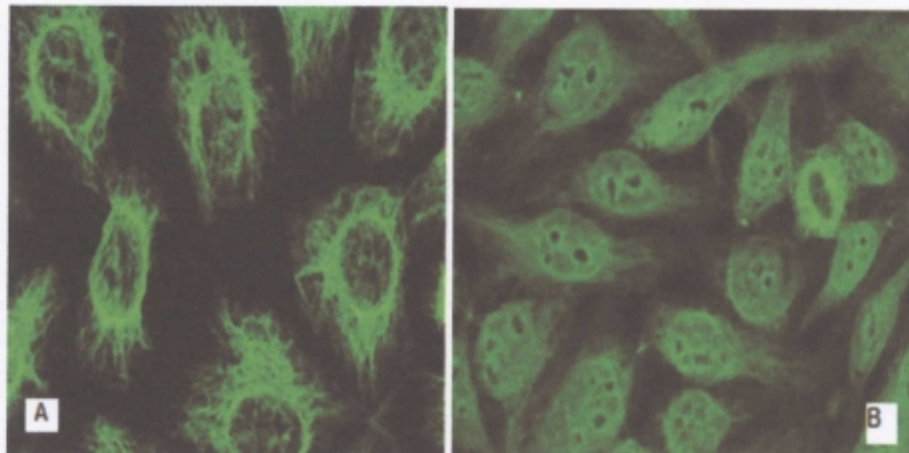


Figure 30 : fluorescence des Acs dirigés contre vimentine A et desmine B sur cellules Hep-2 (47).

IV.1.1.2.1.1.4.2 .2/ Les anticorps donnant une fluorescence granulaire :

a- Grosses granulation paranucléaires et un peu filamenteuses :

Cet aspect (Figure 31), essentiellement observé sur les cellules en interphase, correspond au marquage de l'empilement de saccules constituant l'appareil de Golgi. Cantonné à proximité immédiate du noyau dont il épouse la convexité, il est très caractéristique même si, selon l'état de chaque cellule et son étalement, il peut varier de quelques grosses granulations paranucléaires à une forme, « en résille », plus étendue ; il est parfois associé avec de très fines granulations diffuses dans le cytoplasme qui correspondent aux diverses vésicules assurant les transits moléculaires d'un compartiment à l'autre(65).

- **Antigènes :**

Différents antigènes ont été identifiés. Un d'entre eux est une protéine de 230KDa localisée au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi dont la fonction est mal connue(65) .

- **Associations cliniques :**

La présence d'auto-anticorps dirigés contre l'appareil de Golgi avec un titre élevé, supérieur ou égal au 1/5 000 est presque toujours indicatrice d'une maladie systémique et en particulier d'un syndrome de Gougerot-Sjögren ou d'une polyarthrite rhumatoïde le plus souvent un peu inhabituelle (séronegativité, tonalité lupique,...) (65).

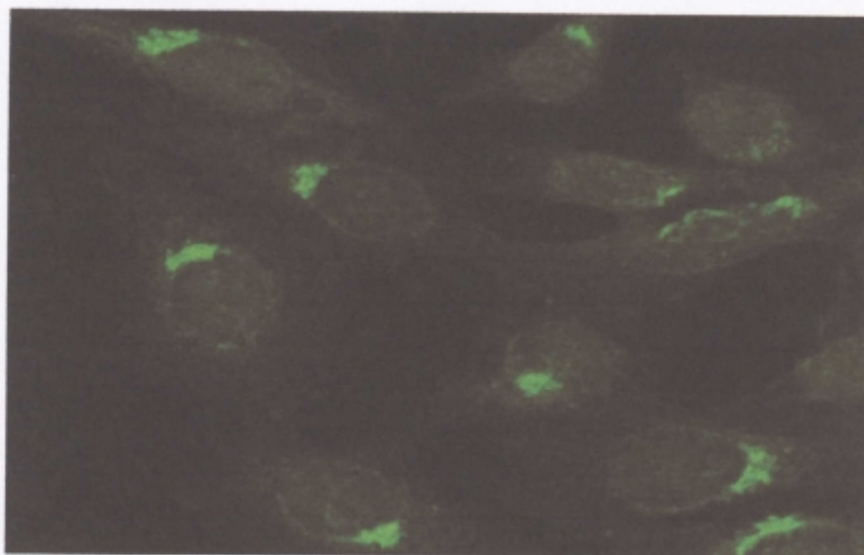


Figure 31 : fluorescence des Acs anti-appareille de Golgi sur cellules Hep-2(47).

4.2.2. Granulations de taille moyenne en chainettes et à prédominance périnucléaire :

Cet aspect (figure 32) évoque fortement la présence d'auto-anticorps anti-mitochondries de la sous-variété dite M2 (voir hépatites auto-immunes plus loin).

Un second type d'anticorps appelé M6 peut cependant aussi donner une fluorescence cytoplasmique sur cellules HEP-2 (65),

Les autres variétés d'auto-anticorps anti-mitochondries classiquement décrites ne donnent pas lieu à un marquage significatif (65).

- **Associations cliniques :**

Les AAM de type M2 sont très évocateurs de cirrhose biliaire primitive où ils sont présents dans environ 95 % des cas ; ils sont notamment quasiment absents chez les sujets en bonne santé ou atteints de maladies non auto-immunes. Leur apparition apparaît précoce dans la maladie, qu'ils peuvent précéder, et leur titre reste en principe stable. Ils peuvent également être présents lors d'hépatite auto-immune de type I ou d'affections volontiers associées à une cirrhose biliaire primitive telles que le syndrome CREST (acronyme de Calcinose, Raynaud, dysmotilité œsophagienne, Sclerodactylie, et Telangiectasies), le syndrome de Gougerot-

Sjögren ou la thyroïdite d'Hashimoto et posent alors la question d'une forme préclinique de la maladie (65).

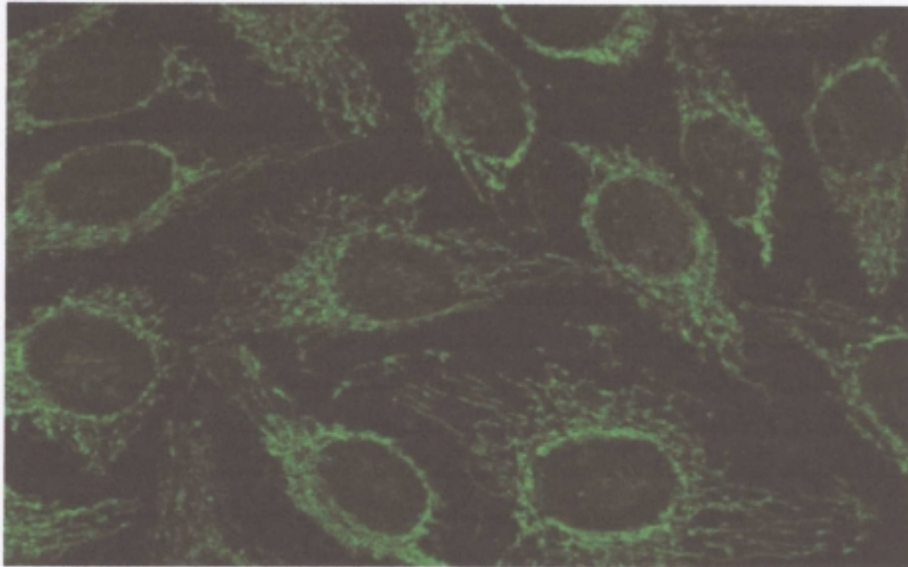


Figure 32 : Aspect des AAM2 sur les cellules Hep-2(47).

4.2.3. Fines granulations diffuses dans le cytoplasme

a- Aspect très dense et "pâteux" avec les vésicules apparaissant en négatif :

Les vésicules apparaissent en négatif et une fluorescence homogène des nucléoles peut lui être associée(65) (figure 33) .

Antigène :

Cet aspect évoque fortement la présence d'aAcS anti ribosomes (Phosphoprotéines P0, PI et P2 protéines ou ARN ribosomal) surtout si lui est associée une fluorescence homogène des nucléoles(65).

Associations cliniques:

Lupus érythémateux disséminé (10-20 %) ; Formes neuropsychiatriques ; ou avec hépatite(65).

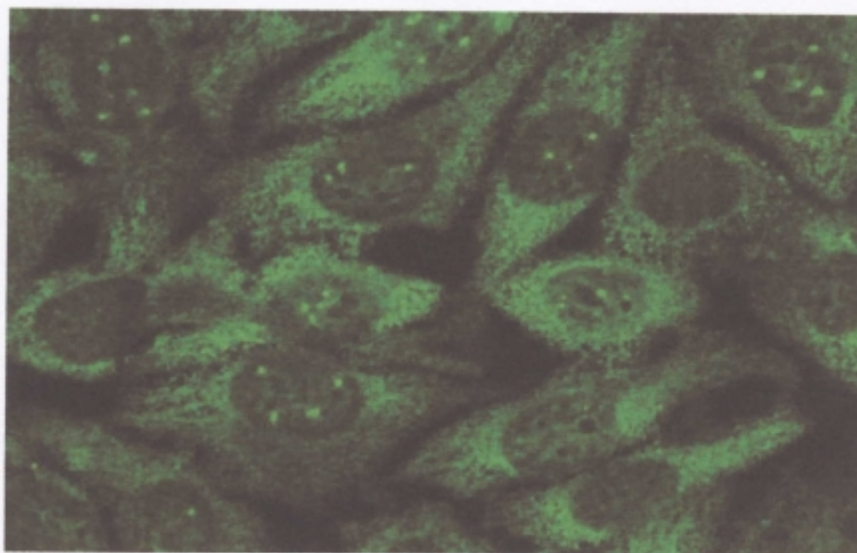


Figure 33: fluorescence des Acs anti-ribosome sur cellules Hep-2 (47).

B-Aspect de grains très fins dispersés avec une faible densité :

Antigènes:

Cet aspect (figure 34) évoque la présence d'autoanticorps dirigés contre les aminoacyl-ARNt synthétases, libres dans le cytoplasme. Ces autoanticorps sont spécifiques chacun d'une seule synthétase et capables d'en bloquer l'activité de Histidyl-ARNt synthétase (JO-1)

Autres aminoacyl-ARNt synthétases :

- Threonyl-ARNt synthétase (PLT)
- Alanyl-ARNt synthétase (P/12)
- Glycyl-ARNt synthétase (EJ)
- Isoleucyl-ARNt synthétase (OJ ou NJ) (65)

Associations cliniques :

Syndrome des anti-aminoacyl-ARNt synthétases (polymyosite) (65) .

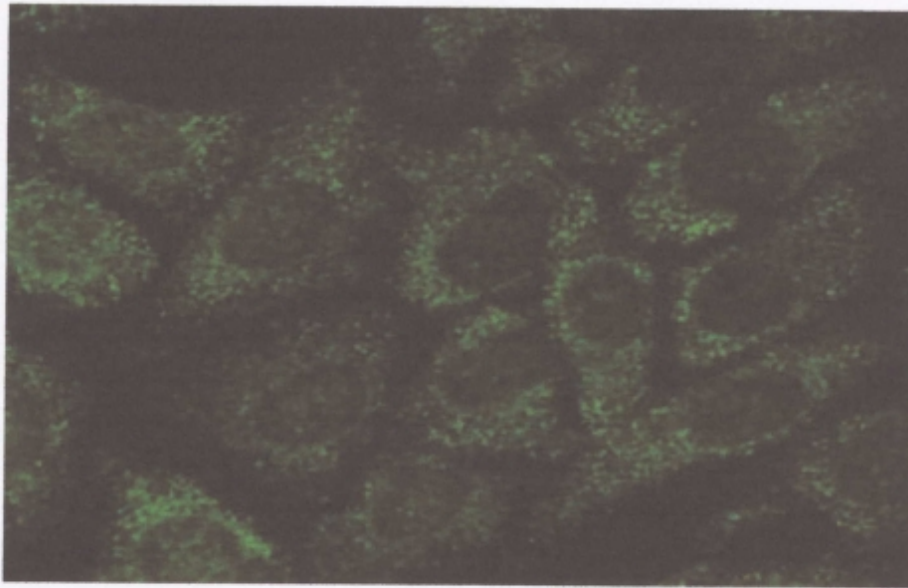


Figure 34 : Fluorescence cytoplasmique des aAcs anti-JO-1 (47).

Remarque :

La fluorescence cytoplasmique des cellules Hep-2 doit être conduite à entreprendre une série d'analyses complémentaires à commencer par l'immunofluorescence indirecte sur coupes d'organes de rat, afin d'en rechercher les cibles potentielles (65).

IV.1.2/ Les autoanticorps anti-ADN natif:

IV.1.2.1/ Définition :

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN bicaténaire ou double brin est enroulé autour des histones H2A, H2B, H3 et H4, l'ensemble étant « fermé » par l'histone H1. Cette structure réalise ce qui est appelé l'ADN natif.

Découverts en 1957 par Seligmann et Cepellini ; les auto anticorps anti-ADN natif constituent une grande famille d'anticorps qui diffèrent par leurs classes (IgM, IgG,...), leurs sous-classes (IgG1 ,IgG2...) leurs capacité de fixation du complément, leurs charge électriques, leurs spécificités allo et idiotypiques mais aussi surtout par leur spécificité anticorps classes en 3 catégories :

- Les anticorps qui ne se combinent qu'avec l'ADN bicaténaire .

- Les anticorps qui se combinent avec l'ADN bicaténaire et l'ADN monocaténaire (dénaturé).
- Les anticorps anti-ADN monocaténaire.

Plusieurs épitopes peuvent être reconnus au sein de l'ADN certains communs au 2 types de l'ADN (simple et double brin) pourraient constituer l'épine dorsale de la molécule d'ADN par la succession de désoxyribose et de bases nucléotidiques. D'autres épitopes propres à l'ADN natif bicaténaire pourraient être formés par des déterminants conformationnels. Certains, en fin, propres à l'ADN monocaténaire, seraient des segments profondément enfouis dans l'ADN, n'apparaissent qu'après séparation des deux hélices. L'appellation d'anticorps "anti-ADN natif" regroupe les anticorps des deux premiers types alors que l'appellation "anti-ADN simple brin" est réservée à ceux du troisième type; un même sérum peut contenir ces trois types d'anticorps anti-ADN avec des proportions variables d'une maladie à une autre(55)

IV.1.2.2/ Les techniques d'identifications des anticorps anti- ADN natif :

La mise en évidence d'anticorps anti-ADN natif s'intègre dans une procédure plus générale de recherche des anticorps anti-nucléaires qui met en œuvre différents tests biologiques. La première étape consiste à rechercher des anticorps anti-nucléaires par technique d'immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2. Un aspect de fluorescence nucléaire homogène à un seuil significatif supérieur au $1/80^{\text{ème}}$; est évocateur de la présence d'anticorps anti-nucléaires de spécificité anti-ADN et/ou anti-histone.

La confirmation de la spécificité "anti-ADN natif " des anticorps anti-nucléaires peut se faire par plusieurs techniques (67).

Trois techniques sont le plus souvent utilisées pour la mise en évidence des anticorps anti-ADN(68) :

- * L'immunofluorescence indirecte sur *Crithidia luciliae*.
- * Le test de Farr.
- * Le dosage immunoenzymatique.

IV.1.2.2.1/ L'immunofluorescence indirecte sur *Crithidia luciliae*:

IV.1.2.2.1.1/ Le Substrat :

On utilise des étalements de *Crithidia luciliae* fixés après un léger choc hypotonique, ce dernier permettant d'obtenir des trypanosomes suffisamment globuleux pour bien distinguer le kinétoplaste.

Les *Crithidia 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 : il est donc facile de réaliser des "préparations maison". Des lames commerciales sont également proposées ; le choix est difficile car les tests réalisés lors d'appel d'offres montrent que les résultats ne sont pas superposables. Les CL contiennent un noyau, un kinétoplaste (taille et localisation nettement différenciables) et un seul flagellé effilé (figure 29). 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 (68).

IV.1.2.2.1. 2/ La dilution :

Les sérums à tester sont dilués au 1/10ème en eau physiologique.

IV.1.2.2.1. 3/Le conjugué :

On utilise un antisérum polyvalent anti-immunoglobulines humaines conjugué à un fluorochrome (fluoresceine) (antiglobulines spécifiques des isotypes IgG et IgM et non des antiglobulines polyvalentes (30)) à une dilution appropriée, en général au 1/100ème.(69).

IV.1.2.2.1.4/ Aspect et interprétation :

Est seule considérée positive la fluorescence du kinétoplaste, le plus souvent homogène, ou cerclée ou rarement ponctuée (figure 35).

La fluorescence du noyau ou celle de la base du flagelle 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(69).

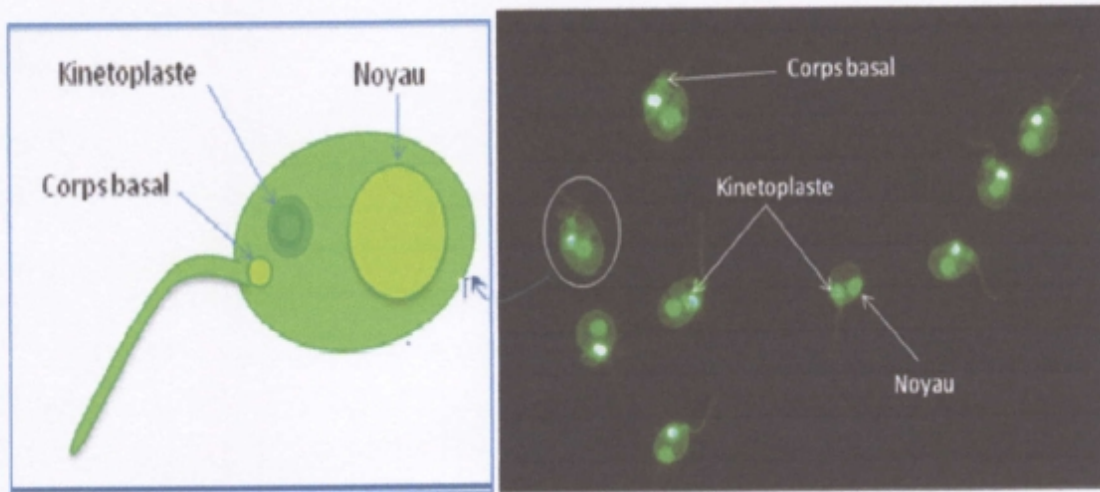


Figure 35 : aspect des anti-ADNn sur *Crithidia luciliae* (50)



Figure 36 : Sérum négatif sur *Crithidia luciliae* (50) .

IV.1.2.2.1.5/ Intérêt de l'IFI :

L'IFI couple une bonne sensibilité avec la spécificité, il s'agit d'une méthode de choix pour le dépistage. Cette technique est peu onéreuse, elle est surtout pratique car elle n'utilise pas de radioéléments mais un substrat facile à entretenir. De plus, elle est spécifique des anticorps anti-ADNn d'affinité intermédiaire ou élevée. Les faux négatifs en *Crithidia luciliae* sont rares : dissociation ADN/auto-anticorps par augmentation de la concentration saline si les puits sèchent (49), très exceptionnellement par phénomène de zone (44).

IV.1.2.2.1.-6/ Valeur diagnostique des Ac anti-ADNdb :

Seuls les anticorps d'isotype IgG sont associés au LES. Cependant les sensibilités et spécificités des Ac anti-ADNdb au cours de la pathologie lupique varient considérablement selon la technique de détermination. Ainsi dans la littérature, la sensibilité de ce test varie entre 35 et 90 % selon la méthode utilisée mais aussi selon la population étudiée. Aussi ils ont été retrouvés au cours d'autres connectivites comme le syndrome de Sharp ou le syndrome de Gougerot-Sjögren, mais aussi au cours d'hépatites auto-immunes de type I (anciennement appelées hépatites lupoïdes) ou du syndrome primaire des anti-phospholipides sachant qu'il n'existe aucun anticorps dont la spécificité soit absolue et il faut admettre pouvoir retrouver un autoanticorps dans d'autres pathologies auto-immunes que celle de prédilection.

Enfin un taux élevé d'Ac anti-ADNdb doit être interprété à la lumière du contexte clinique mais aussi avec la recherche des Ac antinucléaires totaux et éventuellement des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles si besoin (66).

IV.1.2.2./ Autres (68):

- Le test de Farr .
- Le dosage immunoenzymatique (ELISA).

Tableau I : principaux aspects de la fluorescence des auto-anticorps sur cellules HEp-2 et leurs signification clinique.

Localisation de la fluorescence	Antigènes associés	Maladie
Anticorps à localisation nucléaire : facteur anti nucléaire(FAN)		
Nucléaire homogène	ADN natif	LED(100%)
	Histones	LED induit (50%)
Nucléaire périphérique	ADN natif	LED (spécificité 95% sensibilité 70% .)
Nucléaire moucheté	Sm	LED 10 a 35 %
	RNP	Connectivites mixtes
	SSA	LED(10%)/ Sjogren(80%)
	SSB	Sjogren
Nucléolaire	ARN	LED/Sclérodermie
	Proteines nucléolaires	
Anticorps à localisation cytoplasmique		
Microfilaments	Actine	Hépatite chronique active(85%)
Mitochondries	Ags mitochondriaux	Cirrhose biliaire primitive(95 %)
Ribosomes	Ags ribosomiaux	LED (10-20 %)
Golgi	Ags de l'appareil de Golgi	Signification inconnue

VI.1.2/Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) :

VI.1.2.1/Définition :

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) constituent un groupe hétérogène d'auto-anticorps circulants dirigés contre des protéases situées dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles (PNN) et le lysosomes des monocytes(43,72). Les ANCA sont classiquement rapportés dans les vascularites systémiques touchant les vaisseaux de petit calibre dites vascularites à ANCA : la polyangéite microscopique (PAM), la granulomatose de Wegener (GW), le syndrome de Churg- Strauss (CSS) et leur variante localisée, la glomérulonéphrite (GN) nécrosante à croissant (73 , 74). Cependant, ces auto-anticorps sont de plus en plus décrits dans d'autres pathologies et le lien physiopathologique avec ces dernières n'est pas toujours facile à établir(75).

les cibles antigéniques des ANCA sont surtout des enzymes dans les granules cytoplasmiques des polynucléaires neutrophiles. les enzymes principales des granules sont la myéloperoxydase et des sérine protéases (élastase, cathepsine G ,proteinase (73), d'autres constituants, comme le lysozyme , pourraient également être antigéniques ,les monocytes contiennent d'ailleurs des granules équivalents. les granules secondaires se forment plus tardivement dans la différenciation des polynucléaires neutrophiles et renferment la lactoferrine et des protéines de liaison pour la vitamine B12 (76).

VI.1.2.2/ Principales cibles des ANCA:

a-Protéinase 3 (PR3) :

La cible principale des c-ANCA est la PR3 qui est une sérine protéinase de 29 kDa. La PR3 est retrouvée seulement chez l'homme et les primates dans les différents granules du PNN et en particulier dans les granules I (encore appelés granules α ou azunophiles). Dans les phagosomes du PNN, la PR3 est chargée de détruire les bactéries en association avec l'élastase (54 % d'homologie), la cathepsine G (35 % d'homologie) et les radicaux oxygénés. La PR3 est également capable de cliver des cytokines, l'interleukine-8 par exemple, le C1 inhibiteur et la nicotinamide adénine .dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxydase) ce

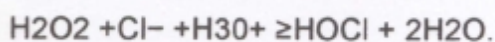
qui contribue à accroître le processus inflammatoire. Dans certaines conditions pathologiques et en particulier dans la GW, la PR3 peut se retrouver à la surface de la cellule si les PNN expriment la molécule CD177 ou NB1 qui est capable de fixer la PR3 mature (78). L'inhibiteur plasmatique de la PR3 est l' α 1-antitrypsine.

Plusieurs étapes sont nécessaires pour que la PR3 soit capable d'exercer son activité biologique. Tout d'abord, une préproprotéine est synthétisée à partir de l'ARNm, puis transformée en pro-protéine inactive dans le réticulum endoplasmique (RE) par clivage du peptide d'adressage. La pro-protéine immature sera ensuite clivée, glycosylée et stabilisée par quatre ponts disulfures afin de rendre le site actif de l'enzyme accessible à ses substrats. dans la cellule, 10—20 % du PR3 est sous forme de pro-PR3(77) .

a- Myéloperoxydase(MPO) :

La majorité des p-ANCA associés aux vascularites reconnaissent la MPO autour du noyau des PNN du fait de la redistribution artéfactuelle de cette dernière lors de la fixation par l'éthanol. La MPO est exprimée en quantité très importante par le PNN (> 5 % des protéines totales). Cette protéine est formée à partir d'un précurseur de 80 kDa qui est clivé pour donner un dimère glycosylé constitué d'une chaîne α de 59 kDa et d'une chaîne β de 13,5 kDa. La MPO est contenue dans les granules I des PNN et les lysosomes des monocytes.

La MPO catalyse la formation de l'acide hypochloreux (HOCl) selon la formule :



L'hypochlorite est un puissant agent bactéricide et antifongique. L'inhibition de la MPO est assurée par la céruléoplasmine (77) .

VI.1.2.3/ La recherche des ANCA :

La mise en évidence des ANCA est basée sur une caractérisation en deux étapes :

- Une étape de dépistage sur frottis cellulaire de polynucléaires neutrophiles humains.
- Une étape d'identification des deux cibles antigéniques les plus importantes, la PR3 et la MPO par des techniques immunologiques spécifiques utilisant des antigènes purifiés (ELISA, Immuno-dot).

VI.1.2.3.1/Techniques de dépistage:

L'immunofluorescence indirecte (IFI) constitue la méthode de référence pour la mise en évidence des ANCA dont les bases ont été fixées lors de différents workshops dédiés aux ANCA (82,83).

VI.1.2.3.1.1/L'immunofluorescence indirecte (IFI) :

VI.1.2.3.1.1.1/Substrats utilisés :

L'immunofluorescence indirecte est réalisé sur des préparations du commerce ou des lames « faites maison » par cyto-centrifugation de polynucléaires humains de sujets de groupe "O"(83). Les polynucléaires une fois isolés et lavés, sont placés dans une solution hypotonique et étalés sur des lames. Cette préparation va pouvoir être fixée soit à l'éthanol soit au formol ou au méthanol (86).

Certains auteurs ont proposé de substituer les PNN par des lignées cellulaires issues de leucémies myéloïdes chroniques (85), mais cette pratique n'est pas généralisée.

VI.1.2.3.1.1.2/Les sérums à étudier :

Les sérums à tester ne doivent pas être inactivés par la chaleur, car cela peut entraîner des fausses positivités. Ils sont dilués au 1/40^{ème}, dans le PBS ou est ajoutée de l'albumine bovine (BSA) à 1% , afin de diminuer le bruit de fond.

VI.1.2.3.1.1.3/Choix de l'immunoglobuline :

Les ANCA sont principalement des immunoglobulines de classe IgG (IgG1 et IgG4). Toutefois, la spécificité, la classe puis la sous-classe des ANCA peuvent varier avec des IgM au début de la maladie alors que la présence d'IgG3 prédominerait dans les formes actives et/ou récidivantes associées à une atteinte rénale (87).

Notons que dans de rares cas, il a été décrit des ANCA exclusivement de type IgM lors d'hémorragies pulmonaires et de type IgA dans les vascularites de type purpura rhumatoïde, et dans les dermatoses neutrophiliques et en particulier l'Erythema elevatum diutinum, de

cholangite sclérosantes, d'hépatite auto-immunes et de néphropathies à IgA, ainsi que dans les vascularites leucocytoclassiques et dans des cas isolés (89).c'est pourquoi il est recommander d'utiliser soit (84) :

- Antiglobulines polyvalentes (anti-IgG, -IgA, -IgM), couplée à la fluorescéine.
- Antiglobuline monospécifique anti-IgG (H+L) détectant les chaînes lourdes γ ainsi que les chaînes légères L.

La dilution de ce conjugué varie avec la marque et le lot du réactif. S'il s'agit de sérum de patients suspects de purpura rhumatoïde, il est intéressant, d'utiliser une anti-IgA fluorescente en s'assurant qu'elle ne donne pas de fausses positivité. (86)

Remarque :

Différentes bonnes pratiques ont été étiquetées à savoir le recours systématique à des contrôles négatifs et positifs (c-ANCA/PR3+ et p-ANCA/MPO+) pour chaque série de lames. En effet, il a été constaté que certains antigènes pouvaient être détruits lors de la préparation des PNN ou suite à la dessiccation des cellules. De plus, la réalisation de plusieurs dilutions pour un même patient est vivement recommandée pour se prémunir du « phénomène de prozone ». Ce phénomène pouvant se traduire par une réaction faussement négative à une faible dilution mais positive au plus dilutions du fait de l'excès d'auto-Ac dans le sérum(90).

VI.1.2.3.1.1.4/Aspects de fluorescence donnés par les ANCA :

A-Aspects sur PNN fixées à l'éthanol :

La fixation à l'éthanol de la méthode de référence entraîne une distribution particulière des antigènes reconnus par les ANCA, donnant en immunofluorescence des aspects caractéristiques en fonction de l'antigène reconnu (92).

1. L'aspect c-ANCA typique : cet aspect est caractérisé par une fluorescence diffuse et granuleuse du cytoplasme avec un renforcement entre les lobes du noyau (figure 37).

Il correspond en général à des anticorps anti-PR3, mais d'autres spécificités peuvent parfois donner cet aspect (93).

2. L'aspect c-ANCA atypique : fluorescence cytoplasmique homogène "plate" ne correspondant ni à des anti-PR3, ni à des anti-MPO(94).

3. l'aspect p-ANCA typique : il se caractérise par une condensation de la fluorescence autour du noyau, c'est-à-dire périnucléaire, avec ou sans extension nucléaire, sans marquage cytoplasmique (figure 1) ; il correspond en général à des anti-MPO (95).

4. L'aspect p-ANCA atypique (a-ANCA) : qui est caractérisé par un fin liseré périnucléaire. Cet aspect peut être donné par des NANA (Nuclear Associated Neutrophil An'iibodies) rencontrés dans la rectocolite hémorragique ; ils sont parfois désignés par le terme de x-ANCA qui indique l'absence de spécificité antigénique définie. Il est cependant parfois difficile en IFI sur cellules fixées à l'éthanol de différencier un aspect p-ANCA atypique d'un p-ANCA typique(94).

5. D'autres aspects : beaucoup plus rares, peuvent être rencontrés, en particulier l'association c-ANCA + p-ANCA (94).

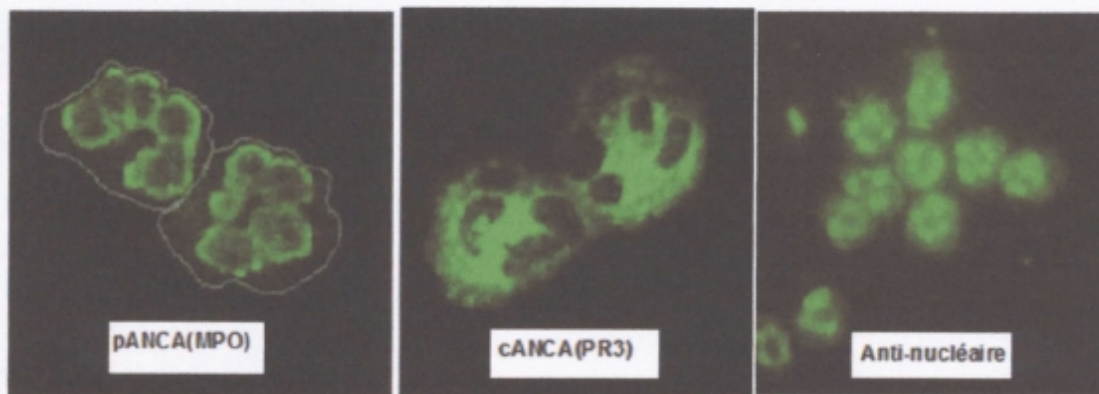


Figure 37 : Aspects de fluorescence des PNN humains fixés par éthanol (116).

f. Enfin, une grande difficulté d'interprétation de l'immunofluorescence indirecte est due à la présence **d'anticorps antinucléaires (ANA)** dont certains sont spécifiques des polynucléaires humains GS-ANA pour (Granulocyte Specific AntiNuclear Antibodies) (95). Ces ANA peuvent donner une image tout à fait semblable au p-ANCA typiques (figure 37). C'est pour cela qu'il faut toujours, en présence d'une image p-ANCA, rechercher les ANA sur cellules HEp-2 (figure 38). Certains ANA cependant, donnent des images caractéristiques et tout à fait différentes des ANCA : c'est le cas des anti-centromères, des ANA à grains multiples "nuclear dots" et des anti-ribosomes. (94).

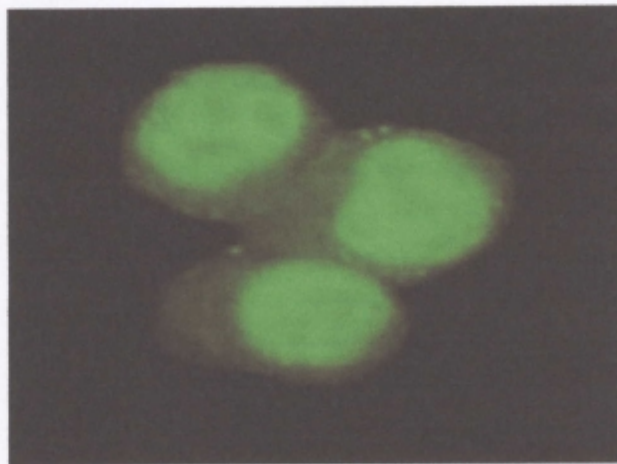


Figure 38 : Fluorescence des cellules HEp-2 fixées par méthanol (116).

A-Aspects sur PNN fixées par autres fixateurs :

L'utilisation d'autres fixateurs que l'éthanol permet de mieux différencier les anticorps produisant ces différents aspects (Annexe VI) (96).

VI.1.2.3.1.1.4.2.1/Le formol :

Le formol maintient les constituants nucléophiles dans les granules et prévient leur redistribution artéfactuelle. Ainsi, les c-ANCA et les p-ANCA typiques produisent sur polynucléaires fixés au formol le même type de fluorescence cytoplasmique granulaire et diffuse (figure 39). Ni les anticorps anti-nucléaires, ni les p-ANCA atypiques ne réagissent sur

ces cellules fixées au formol, bien que certains auteurs) (97) décrivent en microscopie confocale un aspect particulier des p-ANCA atypiques sur cellules fixées au formol.

En effet, la fixation à l'éthanol entraîne une libération de la myéloperoxydase des granules cytoplasmiques et, du fait de sa charge fortement cationique, celle-ci se lie à la chromatine anionique du noyau, d'où l'aspect p-ANCA. Par la fixation avec le formol, les granules ne sont pas lysés et la myéloperoxydase reste localisée dans le cytoplasme, d'où l'aspect c-ANCA (125).

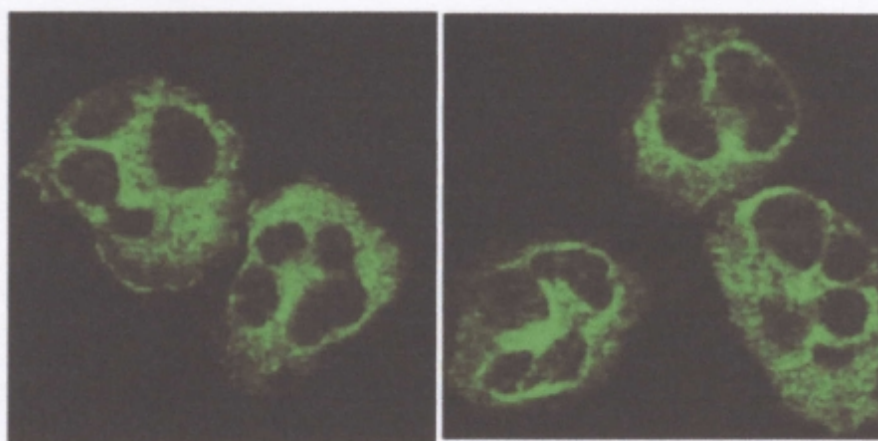


Figure 39 : Aspects de fluorescence des PNN humains fixés par le formol (116)..

A- Le méthanol :

L'utilisation de PNN fixés au méthanol permet de différencier les p-ANCA typiques qui, le plus souvent, ne réagissent pas avec ces cellules des p-ANCA atypiques (associés aux maladies inflammatoires du tube digestif) qui donnent le même aspect que sur cellules fixées à l'éthanol. Les anticorps antinucléaires, en revanche, marquent également les noyaux de ces cellules. On doit savoir cependant qu'il peut exister des p-ANCA ou c-ANCA associés aux ANA. Dans ce cas, les ANCA seront visualisés sur des PNN fixées au formol et les tests ELISA établiront leur spécificité (94).

N.B :

Certains laboratoires utilisent à la place de polynucléaires neutrophiles de sujets normaux des leucocytes de sujets atteints de leucémie myéloïde chronique, fixés au formol/acetone. Ils retrouvent les mêmes aspects p-ANCA et c-ANCA et la majorité des ANA ne marquent pas ces cellules (95)

Tableau II- Aspect de fluorescence des ANCA selon le type de fixateur utilisé (96)

	Ethanol	Formol	Méthanol	Ag
c-ANCA	cytoplasmique	Cytoplasmique	Cytoplasmique	PR3+++ Lamp 2 BPI
p-ANCA	périnucléaire	Cytoplasmique	Négatif	MPO+++ CP-G, LF Elastase
a-ANCA	Atypique	Cytoplasmique ou atypique	Atypique	Lamp 2 BPI CP-G, LF Elastase
ANA	Positif	Négatif	Positif	ANA

CP-G : Cathepsine G ; **LF**: lactoferrine ; **BPI**:Bactericidal permeability increasing factor ;
ANA:Anticorps anti-nucléaire **PR3**: Proteinase 3; **MPO**: Myeloperoxydase.

* **Stratégie de détection des ANCA :**

La détection des ANCA fait donc appelé une cascade de tests utilisant des fixateurs différents : cette stratégie est résumée sur (la figure 34) (94).

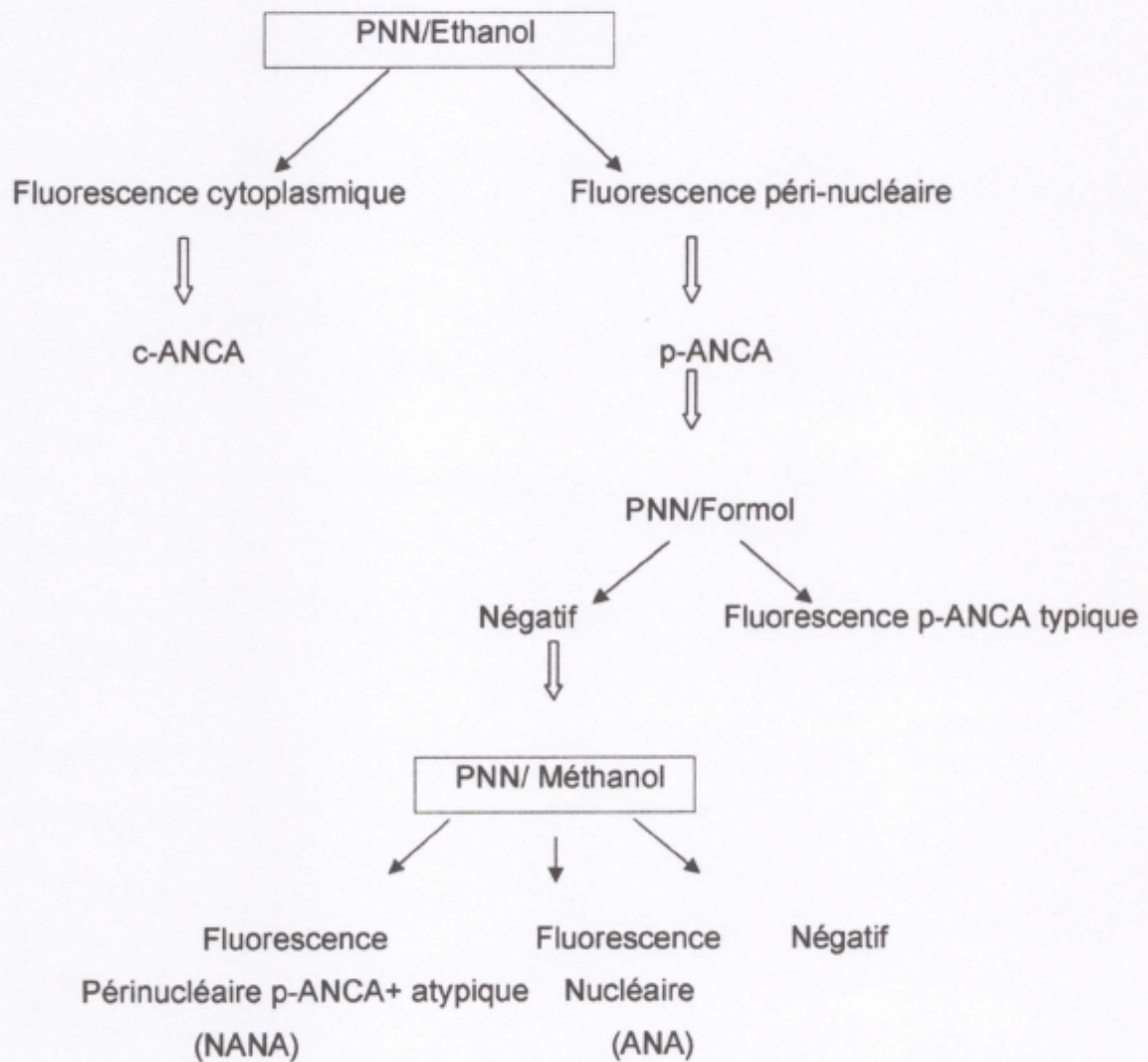


Figure 40 : Stratégie de détection des ANCA(94).

VI.1.2.3.1.2/Autres :

Les ANCA peuvent être aussi dépistés par les techniques **immunoenzymatiques** et le test **ELISA**.

Remarque :

Les sérums sont testés au 1/20^{ème} et au 1/100^{ème}, mais le dernier consensus international (85) recommande un dépistage au 1/40^{ème} pour éviter trop de faux positifs.

A partir du 1/100^{ème}, un titre d'ANCA peut être considéré comme positif et ce sérum sera titré. Il ne faut pas négliger des titres bas d'ANCA : par exemple les maladies de Wegener peuvent débuter par des c-ANCA à des titres très faibles, ce titre augmentant au cours des années avec la gravité de l'atteinte clinique (94).

VI.1.2.3.1.1.5/Interprétation

La recherche des ANCA ne se limite pas aux vascularites des petits vaisseaux, en conséquence, l'interprétation de l'IFI et le choix des examens complémentaires doit s'adapter au contexte clinique (115).

◆ Vascularites à antineutrophil cytoplasmic antibodies :

Dans un contexte de diagnostic, l'IFI sur cellules fixées à l'éthanol constitue la première étape du diagnostic suivi de la caractérisation des cibles et en particulier de la PR3 qui s'associe avec un aspect c-ANCA et de la MPO qui est plus fréquemment rencontrée devant un aspect p-ANCA (115).

Ainsi, une double positivité c-ANCA/PR3+ ou p-ANCA/MPO+ s'accompagne d'une spécificité remarquable pour ce test (> 99 %) quelle que soit la population témoin (sain ou malade) retenue. La contrepartie de cette excellente spécificité est une perte notable de la sensibilité du test (70 %). Plusieurs explications ont été avancées, tout d'abord il est possible de développer une vascularite de type GW sans que des auto-Ac de type ANCA ne soient retrouvés. Pour ces rares patients séronégatifs, c'est le résultat d'anatomopathologie qui sera déterminant. Ensuite, l'IFI peut être positive mais l'Elisa négative, c'est le plus souvent pour des raisons techniques. Enfin, pour 1 à 5 % des patients, seul l'Elisa est positif, d'où l'intérêt d'utiliser à la fois l'IFI et l'Elisa anti-PR3 et anti-MPO en première intention pour le dépistage des vascularites à ANCA (115).

Un patient sur deux avec une GW va récidiver, il est donc important d'utiliser les ANCA pour suivre ces patients (116).

Pour deux tiers des patients, le taux des ANCA est corrélé avec l'activité de la maladie. En conséquence, des variations importantes du taux d'ANCA (le risque de récurrence est doublé à six mois en cas de forte augmentation), une réapparition ou la persistance des ANCA peuvent être utilisées comme signaux d'alarmes. Il est important de rappeler qu'en aucun cas, les ANCA doivent être utilisés seuls pour adapter le traitement puisque la corrélation entre le titre des ANCA et la clinique est imparfaite. À l'inverse, un ANCA négatif est bon indicateur pour considérer que la maladie est bien contrôlée. Pour ce suivi, l'Elisa est préférable à l'IFI, la première technique donnant des valeurs quantitatives alors que la seconde technique est semi-quantitative et dépendante du technicien qui effectue la mesure. Si l'Elisa est retenu, les bonnes pratiques de laboratoire invitent à tester le sérum en parallèle avec le sérum précédent du même patient conservé à -20 °C (116).

◆ **Glomérulonéphrites :**

La positivité des ANCA au cours d'une glomérulonéphrite rapidement progressive (insuffisance rénale en quelques semaines) va permettre d'orienter le diagnostic vers une glomérulonéphrite nérosante pauci-immune à ANCA (GW, polyangéite microscopique et maladie de Churg et Strauss) (116).

En effet, dans ce contexte, la valeur prédictive positive (VPP) des ANCA/PR3+ est de 100 % avec une valeur prédictive négative (VPN) de 82 % [45], alors que ces valeurs sont respectivement de 90 et 71 % pour l'IFI seule. Les formes les plus sévères associent un taux d'anti-PR3 élevé, une créatinémie élevée et une réduction des plaquettes (116).

En situation d'urgence, la thérapeutique pourra être initiée devant la seule positivité des ANCA (IFI et Elisa) mais la preuve histologique (la biopsie rénale) devra être rapidement apportée pour confirmer le diagnostic (116).

◆ **Syndrome pneumoréal de Goodpasture :**

La détection des ANCA au cours du syndrome de Goodpasture (SGP) à anti-MBG présente un intérêt prédictif. En effet, en plus du syndrome pneumoréal classique du SGP des signes cliniques systémiques (fièvres, myalgies, arthrites, signes cutanés) et des lésions de vascularites peuvent être retrouvées conjointement aux ANCA. Les auto-Ac sont retrouvés

chez 5-40 % des patients ayant des auto-Ac anti-MBG. Les ANCA sont dans deux tiers des cas de type p-ANCA/MPO+ et c-ANCA/PR3+ pour le tiers restant. Les ANCA peuvent être détectés au début de la maladie, apparaître au cours de l'évolution, voire après la disparition des anti-MBG. La réponse au traitement des formes rénales serait plus favorable en présence d'ANCA (116).

◆ **Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin :**

Le diagnostic des MICI est souvent difficile et se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, il faut distinguer les MICI des autres pathologies digestives qu'elles soient infectieuses ou non. Ensuite, il est important de différencier la maladie cœliaque de la rectocolite hémorragique puisque l'évolution et la thérapeutique vont différer entre ces deux pathologies. La dichotomie s'effectue sur un faisceau d'arguments cliniques, endoscopiques, histologiques et biologiques. Pour la biologie, la RCH est associée avec la présence d'ANCA le plus souvent de type p-ANCA atypique pour 30 % des patients contre 7 % s'il s'agit d'une MC (118).

À l'inverse, la mise en évidence d'Ac antisaccharomyces b (ASCA) permet d'orienter le diagnostic vers un MC car ils sont présents chez certains patients et absents au cours d'une RCH. La détection des ANCA au cours d'une MICI n'est pas associée avec l'activité de la maladie(116).

Tableau III : Place des ANCA dans les maladies inflammatoires du tube digestif. (93).

	Maladie de Crohn(%)	Réctocolite hémorragique(%)	Autres Colites
ANCA	31	50	13
a-ANCA	7	30	0
ASCA	23	0	0
Anti-LF	77	60	33

VI.1.2.3.1.1.6/ Difficultés rencontrées au cours de la lecture des ANCA en IFI :

- La présence gênante d'anticorps antinucléaires (119).
- La présence d'anticorps anti-ribosomes (P0, P1, P2) peut donner un aspect cANCA atypique. Ces anticorps marquent de façon homogène le cytoplasme des polynucléaires, mais également le cytoplasme des lymphocytes (119).
- Les anticorps anti-muscle lisse donnent également une fluorescence cytoplasmique, mais moins intense (121).
- les sérums hyper-gamma-globulinémiques peuvent marquer de façon homogène le cytoplasme des polynucleaires(120).

VI.1.2.3.2/L'identification des ANCA :

Lorsque les ANCA sont positifs à l'immunofluorescence, on effectue soit un **ELISA** afin d'identifier les antigènes spécifiques contre lesquels sont dirigés les ANCA soit par une autre technique moins sensible comme l'**immunoblot**. En pratique, seuls deux anticorps, dont la signification clinique est claire, sont recherchés. Ce sont les anticorps antiprotéinase 3 (anti-PR3) et les anticorps antimyéloperoxydase (anti-MPO) (126).

VI.1.2.3.3/ Intérêt diagnostique des ANCA :

Le tableau III indique la fréquence des diverses pathologies en fonction des cibles antigéniques des ANCA. Mais bien entendu, en présence des c-ANCA ou p-ANCA typiques, des tests de type ELISA donnant la spécificité de ces anti -corps seront indispensables pour le diagnostic des vascularités. En revanche actuellement, pour le diagnostic des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, on se contentera souvent de l'immunofluorescence indirecte : il n'existe pas en effet de test ELISA permettant de caractériser les p-ANCA atypiques.

Il faut cependant savoir qu'il existe 10 à 20 % de sérums c-ANCA ou p-ANCA positifs en immunofluorescence et négatifs par la technique ELISA, alors qu'il s'agit bien de vascularites.

A l'inverse, environ 5 % des sérums négatifs en immunofluorescence sont positifs en ELISA, anti-PR3 ou anti-MPO (121). Ce qui impose, lorsqu'il y a une forte suspicion de vascularite, de réaliser une recherche en ELISA des anti-PR3 et des anti-MPO (120).

Il est difficile de parler de valeur prédictive, positive ou négative, sans avoir identifié les cibles antigéniques reconnues (MPO ou PR3) (122)

A noter que dans 10 à 30 % des cas de Wegener et de micropolyangéites (121), des anticorps anti-membrane basale glomérulaire sont associés aux ANCA.

Intérêt du titre des ANCA en immunofluorescence indirecte pour le suivi des patients :

Dans environ 80 % des cas de maladie de Wegener, l'évolution du titre des ANCA est corrélée avec celle de la maladie : une amélioration clinique est associée à leur disparition et son aggravation s'accompagne de leur persistance ou de leur élévation (113). Cette corrélation semble plus forte si l'on considère les ANCA d'isotype IgG3 (124). Elle reste néanmoins imparfaite : aussi, en l'absence de manifestations cliniques, les variations de titres des ANCA n'ont qu'une valeur d'alarme, et ne justifient pas de modifier ou d'instaurer un traitement (113). Dans notre expérience, il nous semble que les c-ANCA de la maladie de Wegener se négativent plus souvent que les p-ANCA des micropolyangéites, sous traitement efficace.(119)

Tableau IV : Associations cliniques en fonction de la cible des ANCA (54)

Antiègne	Aspect	Associations cliniques
PR3	c-ANCA	Granulomatose de Wegener (WG) (90%), micropolyangéite (MP) (50%) Churg et Strauss(CS) (30%) Glomérulonéphrites nécrosant pauci-immune(GNPI) (minoritaire), Les colites ulcéreuse (CU) (17%), Polyarthrite rhumatoïde (PR) (17%), l'arthrite chronique active (2%)
MPO	p-ANCA	GW (15%), MP(50%), CS(40%) la périarterite noueuse (62%), Glomérulonéphrites (50%), l'arthrite chronique active(ACA)(8%), CU (10%), GNPI idiopathique (80%),PR (47%).Sclérose systémique (SS) (20%).
BPI	a/p-ANCA	Vascularite systémiques, PR ,LED, Cholangite, Sclérosante primitive (CSP), hépatite auto-immune (HAI), CU, maladie de Crhon (MC).
Cathepsine G	a/p-ANCA	UC (40%), MC (28%), LED , PR , HAI.
Elastase	p-ANCA	CU, Cholangite sclérosante, MP,GW, l'insufisance rénale,....
Lactoferrine	p-ANCA	CU (13%), PR (35%), ACA (16%), polymyosite / dermatomyosite (27%) Cholangite autoimmune (100%), Cirrhose biliaire primitive (36%), CSP (22%), HAI (29%)/

IV.2/ L'apport de l'IFI dans l'exploration des M.A.I.S.O :

IV.2.1/ Les hépatopathites auto-immunes :

Les maladies auto-immun de foie peuvent toucher le parenchyme hépatique proprement dit et les voies biliaires .elles sont représentées par les hépatites chroniques actives auto-immunes de type I et II ,la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante primitive .une réponse auto-immunes peut également s'observer au cours de certaines hépatites virales (principalement hépatites C),médicamenteuses, ainsi que les rejets d'allogreffe hépatique . le diagnostic de ces maladies peut être établi par la mise en évidence dans le sérum d'une variété d'auto-anticorps . (72 ,97)l.

IV.2 .1.1/ les différents auto-anticorps :

a .les anticorps anti-mitochondrie(AAM) :

On distingue plusieurs types AAM , dont le plus important est :

➤ **Le type 2 (AAM2) :**

Les cibles antigéniques des AAM 2 sont clairement identifiées ;ils réagissent essentiellement avec un ensemble des molécules appartenant à la familles des 2-oxo- acide déshydrogénase localisés sur la membrane interne de la mitochondries .cette famille comprend la pyruvate déshydrogénase(PDH) ,l'oxoglutarate déshydrogénase et la déshydrogénase impliquée dans le métabolisme des acides cétoniques à chaine branchée .la protéine E2 du complexe de la PDH constitue l'auto-antigène prédominant reconnu .(98.99)

b.Autoanticorps antimicrosomes de foie et de rein (anticorps « anti-liver /kidney / microsome » [LKM]) :

Ces aAc sont dirigés contre des Ag de la fraction microsomale de cellules hépatiques et rénales. Plusieurs types d'aAc anti-LKM (liver/kidney/microsome) ont été décrits en fonction de l'aspect observé en IFI et des cibles antigéniques reconnues(72) Parmi les Ac anti-LKM on distingue trois formes (100), les Ac anti-LKM1 qui ciblent la forme 2D6 du cytochrome P450

(CYP2D6), les Ac anti-LKM2 qui reconnaissent la forme 2D9 du cytochrome P450 (CYP2D9) et enfin les Ac anti- LKM3 qui détectent l'UDP-glycurorosyl-transférase de type 1 (UGT1) .

c.Autoanticorps anticytosol hépatique (anti-LC1) :

Les aAc anticytosol hépatique (*anti-liver cytosol 1 - LC1*), qui ont été initialement décrits par Martini et al (101) puis confirmés par de nombreuses équipes (102, 103, 104), sont dirigés contre une enzyme du métabolisme de l'histidine, la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD) (105).

d.Autoanticorps antimuscle lisse (SMA) :

Les SMA de spécificité anticâble d'actine sont présents dans 85 % des HAI-1(106) Cependant, cette spécificité actine n'est toujours pas incluse dans la grille de score diagnostique des HAI révisée en 1999 où seul l'antimuscle lisse apparaît (107) La spécificité des anti-actine est de 80 % ; ces aAc peuvent être présents dans d'autres maladies hépatiques (hépatites virales C, B, A, ou médicamenteuses, cirrhose alcoolique, CBP, cancer) et dans des pathologies auto-immunes non hépatiques (connectivites, maladie coéliqua, thyroïdites, diabète, maladie de Biermer)(109,108).

e.Autres

- Autoanticorps antinucléaires (ANA)
- Autoanticorps antimembrane nucléaire : cinq types d'aAc antienvolope nucléaires ont été décrits : aAc anti-gp210 et antinucléopore P62 (Nup62) des pores nucléaires, antilamines, anti-lamina-associated polypeptides (LAP) et antirécepteur à la lamine B (LBR) (72) Les aAc anti-gp210 sont très spécifiques de la CBP, leur mise en évidence affirme donc le diagnostic, même en l'absence d'AAM ; cependant, ils ne sont présents que dans 20 % à 50 % des CBP (110,111).
- Autoanticorps antiantigène soluble du foie (anti-SLA/LP)
- Autoanticorps antirécepteurs à l'asialoglycoprotéine (ASGP-R)
- Autoanticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA)
- Autoanticorps antimicrosome de foie (anti-LM)

- **IV.2.1.1/Les méthodes de détection des auto-anticorps :**

L'IFI sur coupes de foie , rein et estomac de rat reste la technique indispensable en premier intention (72). Il est à noter que certains AAN et les Ac anti-ribosomes sont susceptibles d'être mis en évidence sur ces coupes(112) .Elle a pour avantage de permettre la détection de l'ensemble des auto-anticorps à l'exception des anti –SLA et des anti-ASGP-r. (72). L'identification des cibles antigéniques moléculaires des auto-anticorps a permis le développement des techniques de confirmation (Elisa,dot-blot,western blot,immunodiffusion) .(tableau IV)

Tableau V: principales cibles et techniques de détection des autoanticorps rechercher dans les hépatopathies auto-immunes :**Principales cibles et techniques de détection des autoanticorps recherchés dans les hépatopathies auto-immunes (en dehors des antinucléaires)**

Type d'auto-anticorps	Cibles antigéniques	Techniques de détection
AAM2	Complexe 2-oxo-déshydrogénasique dans la mitochondrie : – sous-unité E2 de la PDH – E3BP – sous-unité E2 des OADC et BCOADC – sous-unité E1- α et E1- β de la PDH	IFI sur triple substrat Confirmation par immunoblot, dot blot, ou Elisa
Anti-LKM1	Cytochrome P450 2D6 humain (ou 2D1 et 2D2 chez le rat), enzyme de détoxification localisée sur le versant externe de la membrane du réticulum endoplasmique Une localisation sur le versant externe de la membrane plasmique est étayée	IFI sur triple substrat Confirmation par dot-blot, Elisa ou double immunodiffusion par réaction d'identité avec un sérum de référence
Anti-LC1	Forminotransférase cyclodésaminase, enzyme du métabolisme de l'histidine localisée dans le cytosol ou associée à la membrane de l'appareil de Golgi	IFI sur triple substrat. La présence d'Ac anti-LKM1 peut mettre en défaut leur présence Confirmation indispensable par dot blot, Elisa ou double immunodiffusion
SMA actine	Épitope conformationnel sur le câble d'actine	IFI sur triple substrat, mais la spécificité anti-actine ne peut être affirmée qu'après confirmation de la fluorescence des câbles d'actine sur cellules Hep-2 traitées à la colchicine ou dot blot antiactine
Anti-SLA	Protéine du complexe tARN ^(Ser) /Sec	Elisa inhibition Elisa ou dot blot sur antigènes recombinants ou purifiés
ASGP-R	Récepteur membranaire d'endocytose aux protéines désialylées Récepteur à plusieurs virus, dont les virus des hépatites B et C Interaction avec des glycoconjugués de la matrice extracellulaire ?	Elisa sur récepteur purifié humain
ANCA	Cibles diverses (élastases, lactoferrine, isotype 5 de la β -tubuline, etc.), la plupart du temps autres que la myéloperoxydase et la protéinase 3 des vasculantes	IFI sur frottis de polymucléaires Confirmation par dot-blot ou Elisa

IFI : immunofluorescence indirecte ; PDH : pyruvate déshydrogénase ; OGDC : cétoglutarate déshydrogénase ; BCOADC : déshydrogénase des acides α -cétoniques à chaîne branchée ; Elisa : *enzyme-linked immunoabsorbent assay* ; ANCA : anticytoplasme des polymucléaires neutrophiles ; ASGP-R : antirécepteur à l'asialoglycoprotéine ; SLA : *soluble liver antigen* ; AAM2 : antimitochondrie de type 2 ; LKM1 : antimicrosomes de foie et de rein de type 1 ; LC1 : anticytosol de type 1 ; SMA : antimuscle lisse de spécificité antiactine.

IV.2.1.1.1/Immunofluorescence indirecte sur triple substrat (coupe de foie/rein/estomac de rat) :

IV.2.1.1.1.1/ Le substrat :

Immunofluorescence indirecte (IFI) se fait sur coupe de foie, rein, et estomac de rat . Chaque puits de la lame de (IFI) d'un même lot contient une coupe de Foie-Rein-Estomac provenant d'un même bloc d'origine. Les différents substrats sont facilement identifiables car ils sont positionnés de façon identique et reproductible d'un puits à l'autre d'une même lame (20) .

L'IFI se fait sur coupe de foie, rein, et estomac de rat . Chaque puits de la lame de (IFI) (figure 41) d'un même lot contient une coupe de Foie-Rein-Estomac provenant d'un même bloc d'origine. Les différents substrats sont facilement identifiables car ils sont positionnés de façon identique et reproductible d'un puits à l'autre d'une même lame (20) .



Figure 41 : Disposition des coupes de foie ,rein et estomac (substrat dans les puits de lame de l'IFI) (20)

IV.2.1.1.1.2/ La dilution de sérum :

Le sérum du malade doit être testé à partir de la dilution au 1/10. En effet si les anticorps anti-noyau et anti-muscle lisse apparaissent bien avec le sérum non dilué les anti-mitochondrie, les anti-microsome de foie et de rein sont invisibles avec le sérum non dilué ou parfois même dilué au 1/4. Par contre à la dilution au 1/10, la quasi-totalité des anticorps devient bien

visible. Pour les différents anticorps, décelés en IF, le phénomène de zone est exceptionnel. Nous n'avons trouvé que l'exemple de 2 anticorps anti-mitochondrie et d'un anticorps anti-muscle lisse non décelables au 1/10 et 1/20 avant d'apparaître très nettement aux dilutions suivantes. Les dilutions de 1/4 en 1/4 sont suffisantes pour titrer un anticorps(97).

IV.2.1.1.1.3/ Aspect et intérêt :

Les différents Ac sont identifiés d'après leur localisation et leur aspect de fluorescence au niveau des trois organes. L'association de plusieurs tissus est indispensable pour pouvoir identifier correctement les Acs (114).

a .Ac anti-muscle lisse :

• Aspect :

Ils sont dénommés ainsi en raison de leur marquage des fibres musculaires lisses.

Comme la F-actine représente la principale cible des Ac anti-ML, il est important d'éviter qu'elle ne se dénature et pour cela il est recommandé de ne pas fixer ou de peu fixer les coupes de tissus.

Le seuil de positivité des Ac anti- ML, exprimé en inverse de dilution, est de 1/80 chez l'adulte et de 1/40 chez l'enfant. L'utilisation d'une antiglobuline humaine polyvalente IgG, IgA et IgM est préconisée.

- **Estomac:** marquage homogène des fibres musculaires de la musculaire muqueuse et de la musculature, ainsi que des relèvements mineurs et majeurs au niveau de l'épithélium cylindrique de l'estomac (figure 42 a) (114).

La fluorescence du muscle lisse donne de nombreuses réactions croisées évoquant l'actine au niveau du foie et du rein.

- **Foie** : marquage de la membrane des hépatocytes donnant un aspect polygonal(114).
- **Rein**: fluorescence au niveau des cellules mésangiales des glomérules, ainsi que dans l'espace péri-tubulaire (aspect en épines) (fig 42 b) (114).

Marquage de la couche moyenne des artères au niveau des trois organes.

L'identification des Ac anti-actine peut être confirmée par IFI sur cellules HEP2 (114)..

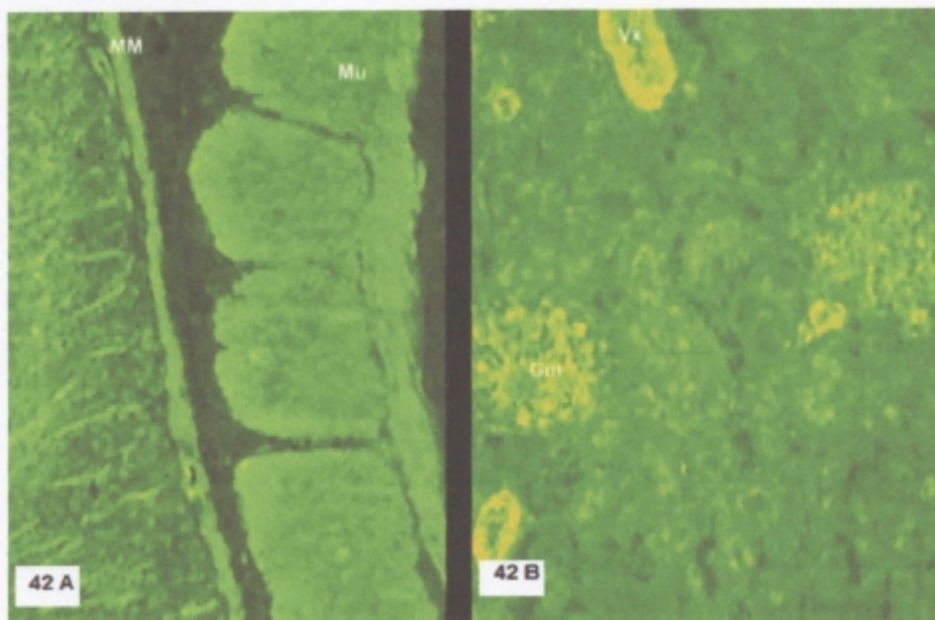


Figure 42 : Anticorps antimuscle lisse par IFI sur estomac de rat (a) , IFI sur rein de rat (b). MM : musculaire muqueuse; Mu : musculieuse; Gm : glomérule; Vx : vaisseaux (117)

• **Intérêt :**

Il s'agit du marqueur le plus sensible de l'HAI de type 1 avec des Ac présents chez 85 % des patients, et typiquement associés avec des Ac antinucléaires (AAN) (124) La spécificité de ce test est imparfaite. L'intérêt des Ac anti-ML se limite au diagnostic d'HAI-1 puisque la réponse au traitement et la gravité des signes cliniques ne sont pas corrélés avec la positivité et/ou le titre des Ac anti-ML (123)

b. Ac anti-LKM1

• Aspect :

Ils sont ainsi appelés car ils réagissent avec le cytoplasme des hépatocytes et de quelques tubules rénaux. La fluorescence de type granulaire prédomine au niveau du cytoplasme des hépatocytes et de la troisième portion des tubules proximaux tels que P3 > P1P2. Il n'y a pas de marquage au niveau de l'estomac (figure 43)(114).

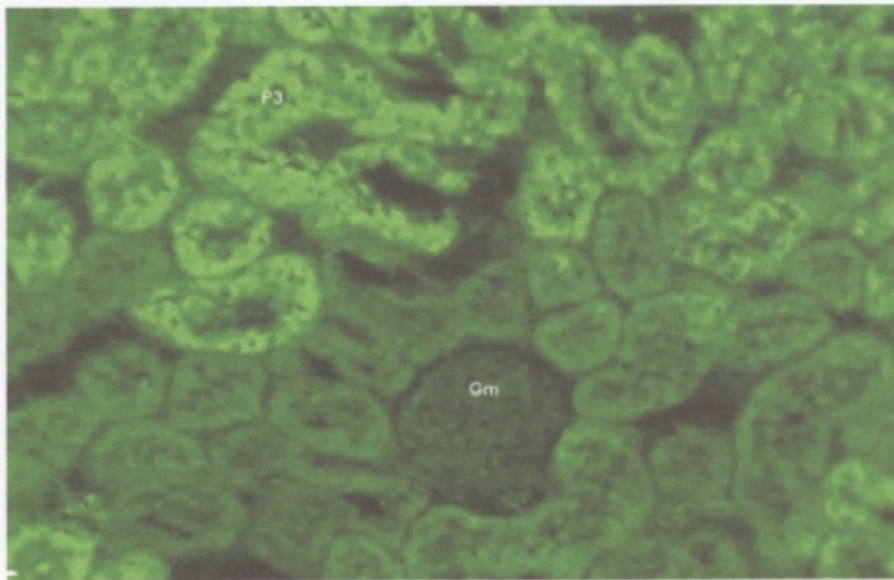


Figure 43 : Ac anti-LKM1 par IFI sur rein de rat. Fluorescence cytoplasmique des tubules proximaux P3 > P1P2. Gm : glomérule; P3 : tubules proximaux P3(114).

Les trois formes d'Ac anti-LKM ont en commun de donner une fluorescence homogène du cytoplasme des hépatocytes, de reconnaître tout ou partie des tubules proximaux du rein, et de fixer les cellules muqueuses de l'estomac. C'est l'analyse de la fixation au niveau des tubules proximaux qui va permettre de distinguer les différents Ac anti-LKM. Si la fluorescence prédomine au niveau de la troisième portion du tube proximal c'est un Ac anti-LKM1 qui sera suspecté. Pour les Ac anti-LKM3, la fluorescence est plus marquée sur la première et la deuxième portion du tube proximal. La fixation des tubules distaux est inconstante et retrouvée pour 10 % des cas. Notons qu'une fluorescence plus marquée des

tubules distaux par rapport aux tubules proximaux devra faire rechercher les Ac anti-mitochondries de type M2 spécifiques de la CBP(126)

• **Intérêt :**

Les Ac anti-LKM1 sont des marqueurs d'HAI de type 2 ;Ce sont les Ac anti-LKM1 qui prédominent dans 50 à 70 % des cas d'HAI de type 2, les Ac anti-LKM3 n'étant retrouvés que pour 5 à 10 % des patients. Les Ac anti- LKM2 constituent un cas particulier car ils signent u Contrairement aux marqueurs de l'HAI-1, l'intérêt pronostique est certain, en effet les titres des aAc anti-LKM1 variant avec le stade de la maladie (lors de la phase aiguë, les aAc sont absents ou de titre faible, à la phase chronique le titre est (élevée et devient très (élevée lors de la phase cirrhotique de la maladie) et le traitement utilisée (un traitement par cyclosporine ou la transplantation hépatique entraînent. une négativation des aAc dans 60 % ; 70 % des cas) (127)ne hépatite-immunoallergique particulière induite par l'acide tienilique. (126)

c.Ac anti-LC1

• **Aspect:**

Les Ac anti-LC1 sont caractérisés par une fluorescence homogène du cytoplasme des hépatocytes à l'exception des hépatocytes situés au contact des veines centrales. La mise en évidence des Ac anti-LC1 peut être masquée en cas d'association avec des Ac anti-LKM1. (126)

La fluorescence cytoplasmique du foie épargne les hépatocytes autour des veines sus-hépatiques.(figure 44)

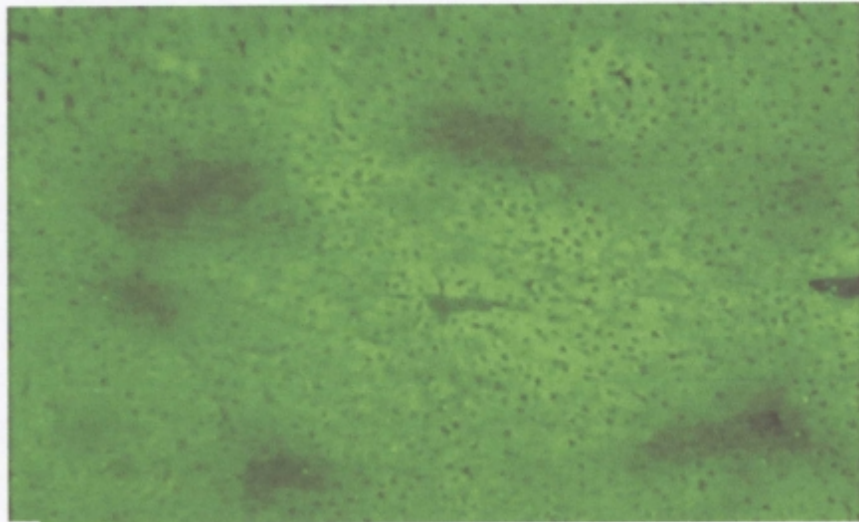


Figure 44 : Ac anticytosol. IFI sur foie de rat. Les hépatocytes juxtaveineux, autour des veines sus-hépatiques, sont négatifs.

• **Intérêt :**

Ces Ac signent une HAI de type 2 pour 30 % des patients. Pour deux tiers de ces derniers, les Ac anti-LC1 sont associés aux Ac anti-LKM1 alors qu'ils sont isolés pour le tiers restant. donc leur détection par IFI peut être difficile en cas d'association aux aAc anti-LKM 1 d'où la nécessité des techniques de confirmation Les Ac anti-LC1 évoluent avec la maladie,. toutefois l'intérêt de ce marqueur dans le suivi des patients n'est pas partagé par tous. (126)

Leur spécificité n'est pas parfaite, ils peuvent être détectés dans d'autres affections auto-immunes du foie, en cas d'HVC ou de porphyrie cutanée tardive (128). Comme pour les anti-LKM, leur titre varie selon le stade de la maladie et le traitement utilisé (126).

d. Ac anti-M2 :

• **Aspect :**

Foie : fluorescence granitée cytoplasmique des hépatocytes.

Rein : fluorescence granitée prédominant au niveau du cytoplasme des tubules distaux tels que D > P1P2 > P3 (figure 45 A).

Estomac : fluorescence prédominant sur les cellules pariétales. L'existence de fines stries dans le tissu musculaire lisse est un signe très évocateur(fig 45 B).

NB :

Un aspect particulier de fluorescence est décelé dans 2 % des CBP. Sur triple substrat, cet Ac marque exclusivement les tubules distaux et les tubes collecteurs du rein, et à un moindre degré les canaux biliaires intrahépatiques. Les tubules proximaux du rein et les cellules pariétales de l'estomac sont négatifs. Cet Ac anti-mitochondries atypique a été appelé anti-M10.

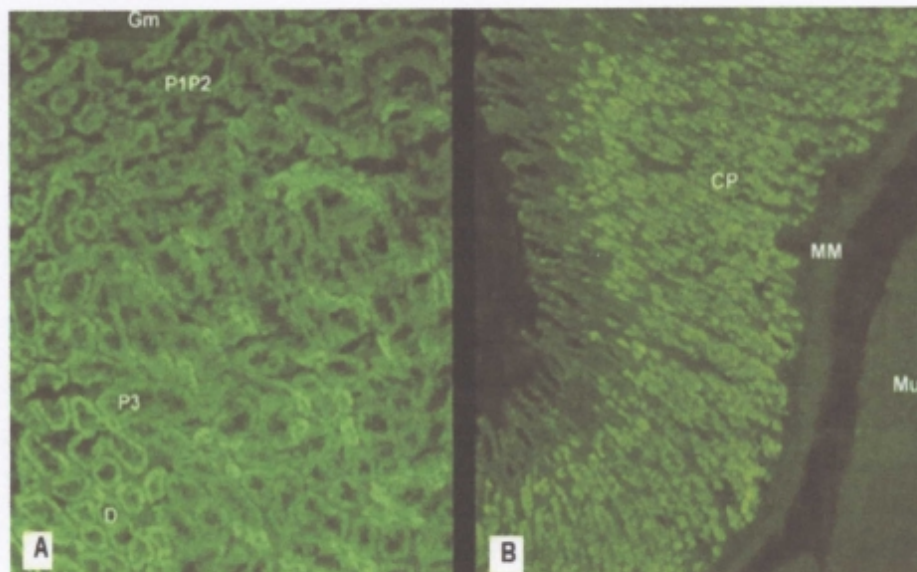


Figure 45: Ac anti-mitochondries 2 sur rein de rat (A), sur estomac de rat(B).

Gm : glomérule; **P1P2** : tubules proximaux P1P2; **P3** : tubules proximaux P3; **D** : tubules distaux; **MM** : musculaire muqueuse; **Mu** : musculature; **CP** : cellules pariétales. (114)

- **Intérêt :**

Les auto-anticorps anti-M2 recherchés par immunofluorescence indirecte restent le meilleur marqueur de la CBP, avec une prévalence de 90 à 99 % . Ils permettent le

diagnostic différentiels entre CBP et autres cholestases intra-hépatiques et peuvent être détectés très précocement, dans les formes asymptomatiques de la maladie. Ils n'ont, en revanche, aucune valeur pronostique. Le titre (généralement supérieur à 1/80) est stable au cours de la maladie et indépendant de la gravité de celle-ci et de la réponse au traitement. Environ 5 % des CBP ne présentent pas ce marqueur et sont dites séronégatives ou cholangites auto-immunes. La spécificité des aAc anti-M2 est très élevée, supérieure à 95 %, on peut néanmoins les observer de façon exceptionnelle dans d'autres pathologies comme les affections auto-immunes associées à la CBP (sclérodermies, Sjögren, Hashimoto), quelques cas d'hémopathies (lymphome de Hodgkin, lymphome splénique à lymphocytes villeux, leucémie à tricoleucocytes), quelques cas d'HVC. Chez l'enfant, la présence d'aAc anti-M2 est rarissime mais correspond à un marqueur d'HAI (129).

Outre l'IFI, l'identification précise des aAc anti-M2 peut être faite par ELISA, dot blot ou western blot à partir d'antigènes recombinant ou natif (fractions mitochondriales de foie de rat ou de cœur de bœuf).

Le western blot est plus sensible que l'IFI et détecte 2 % de CBP supplémentaires. De plus, il reste positif après transplantation hépatique alors que l'anti-M2 n'est plus décelable par IFI dans la moitié des cas (130). Cependant, quel que soit leur profil après transplantation hépatique, aucune corrélation n'est observée avec la récurrence histopathologique de la maladie sur le greffon et ce, quelle que soit la technique de détection utilisée.

Remarques

- 1) L'Ac identifié par l'aspect de fluorescence est ensuite titré. Le seuil de positivité correspond au titre de 1/40 pour les Ac anti-LKM1, anti-LC1 et anti-M2, et de 1/80 pour les Ac anti-ML.
- 2) L'utilisation de ces coupes multiples (foie/rein/estomac de rat) permet de déceler aussi d'autres aAc pas toujours prescrits par les cliniciens. On peut citer :

- Les Ac antinucléaires et anti-membrane nucléaire;
- Les Ac anti-réticuline;
- Les Ac anti-ribosome, marqueurs du lupus érythémateux disséminé;
- Les Ac anti-mitochondries 5, presque toujours associés aux Ac anti-cardiolipine;
- Les Ac anti-mitochondries 6 (hépatite à l'iproniazide) et les Ac anti-LM (hépatite à la dihydralazine) sont très rares, les Ac anti-LKM3 (hépatite delta) sont exceptionnels;
- Enfin, un certain nombre de sérums peut montrer des aspects atypiques, ou la présence d'Ac hétérophiles sans valeur diagnostique.

IV.2.1.1.2/Détection des Ac anti-actine : immunofluorescence indirecte sur cellules HEp2 :

Le principe général est celui de la détection des Ac antinucléaires par IFI sur cellules HEp2.

- Les lames utilisées peuvent être commerciales ou réalisées avec des cellules cultivées au laboratoire.
- La présence de filament d'actine doit être vérifiée au préalable, car de nombreuses préparations commerciales de cellules HEp2 ne conviennent pas.
- Dans le cas de cultures effectuées au laboratoire, les cellules sont directement cultivées sur lame. Des cellules non traitées sont repiquées dans un milieu contenant 14 mg/L de colchicine, puis incubées pendant 20 heures à 37 °C. Après lavage en phosphate-buffered saline (PBS) et fixation à l'acétone à -20 °C, les lames sont séchées rapidement et conservées à -80 °C.
- Les sérums sont testés au 1/20.
 - **Aspect observé :**
- L'ensemble de la cellule est traversé et déformé par de longs câbles droits d'actine (fig 46A).
- D'autres AAc donnant une réactivité avec le muscle lisse peuvent être identifiés sur cellules en culture, par exemple, les Ac anti-vimentine qui montrent une positivité de la vimentine rétractée par la colchicine autour du noyau (fig 40 B). Ces Ac, qui ne sont

pas spécifiques, sont décrits dans de nombreuses pathologies (virales notamment hépatites virales A et B, parasitaires, maladies de système...).

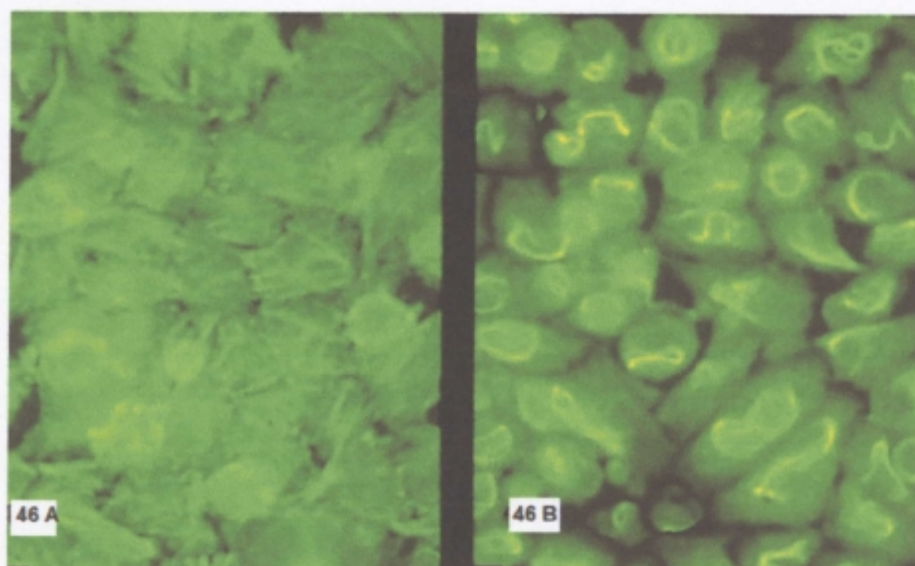


Figure 46 : IFI sur cellules HEP2 traitées à la colchicine ,A. Ac anti-câble d'actine. B. Ac anti-vimentine.(114)

Un aspect incomplet indiquera des Ac de type non-actine ce qui s'observe dans les hépatites virales, bactériennes et médicamenteuses ainsi que dans des affections non-hépatiques.

Dans ce cas, les cibles sont préférentiellement la vimentine, la troponine, la tropomyosine et la désamine des microfilaments ou la tubuline des microtubules(126)

- **Intérêt :**

Les anticorps anti câble d'actine peuvent être présents dans d'autres maladies hépatiques (hépatites virales C, B, A, ou médicamenteuses, cirrhose alcoolique, CBP, cancer) et dans des pathologies auto-immunes non hépatiques (connectivites, maladie coeliaque, thyroidites, diabète, maladie de Biermer) (131). La caractérisation des a.Ac anti-ML se fait par IFI sur

coupes de foie/rein/estomac de rat , leur typage en aAc anti-actine se fait par IFI sur cellules HEp-2 traitées à la colchicine .

IV.2.1.1.3/Les autres méthodes :

L'identification des cibles antigéniques moléculaires des auto-anticorps a permis le développement des techniques de confirmation qui sont : Elisa,dot-blot, western blot.

Tableau IV : Principaux auto-anticorps des hépatopathites auto-immunes :

Auto-anticorps	la spécificité	Maladie associée
Ac anti-muscle lisse	85 %	l'HAI de type 1
Ac anti-LKM1	50 à 70 %	HAI de type 2
Ac anti-LC1	30 %	HAI de type 2
Ac anti-M2	90 à 99 %	CBP
Autoanticorps antinucléaires , Autoanticorps antimembrane nucléaire, anti-SLA/LP, ASGP- R, ANCA, anti-LM	—	—

IV.2.2/Maladies auto-immunes du tube digestif :

IV.2.2.1/Gastrite A :

IV.2.2.1.1/Définition :

Elle est définie par une atteinte diffuse de la muqueuse gastrique intéressante surtout le corps gastrique et le fundus .le sérum des patients atteints de gastrite A renferme des auto-anticorps réagissent avec les cellules pariétales ; l'antigène cible de ces anticorps était précisément l'enzyme ATPase H⁺/ K⁺(la pompe à protons), située au pôle apical des cellules pariétales de la muqueuse gastrique et qui assure la sécrétion de l'acide chlorhydrique dans l'estomac(115). D'autres anticorps ont été décrits : anticorps anti-pepsinogène ; pratiquement ces anticorps ont peu d'intérêt dans le diagnostic de la gastrite A (113).

Une complication grave de la gastrite A est la survenue d'une anémie macrocytaire et mégaloblastique qui est liée à un déficit d'absorption de la vitamine B12 et qui a pour cause la présence d'anticorps anti-facteur intrinsèque qui bloquent la liaison de la vitamine B12. Ceux-ci peuvent très facilement être mis en évidence par ELISA ou immunodot dans le sérum. Ils constituent le signe le plus spécifique de l'anémie de Biermer (116).

Les anticorps anti- cellules pariétales se recherche communément par immunofluorescence sur coupe d'estomac de rat. Des tests Elisa utilisant comme antigène une fraction microsomale purifiée et enrichie en ATPase H⁺/ K⁺ sont actuellement utilisables pour la recherche et la caractérisation des anticorps anti- cellules pariétales (113).

IV.2.2.1.2/Immunofluorescence indirecte et anticorps anti- cellules pariétales :

IV.2.2.1.2.1/Le substrat :

Les coupes d'estomac de rat sont le support antigénique pour la recherche des anticorps anti-cellules pariétales par IFI (1). Ces coupes sont fournies par les prélèvements de muqueuse gastrique (conservés dans l'azote liquide sous une épaisseur de 4 µm au Cryostat (118) obtenus après gastrectomie pour ulcère duodéal(116).

Un témoin *négatif* doit être réalisé sur rein de rat(119)

Remarque :

Ces anticorps sont spécifiques d'organe mais non d'espèce. On peut donc utiliser aussi bien de l'estomac de rat ou de souris que de primate. Des réactions faussement positives sur l'estomac de rat peuvent être observées lorsque le sérum renferme des *anticorps hétérophiles* (le terme hétérophile signifie que l'anticorps humain pourrait reconnaître un antigène spécifique au rat). Par contre, ces derniers ne marquent pas les cellules pariétales gastriques de souris ou de primate. (115)

IV.2.2.1.2.2/La dilution du sérum :

Le sérum sera dilué au 1/40^{ème}.

IV.2.2.1.2.3/Aspect et l'interprétation :

Le marquage est cytoplasmique, avec une accentuation au niveau du bord apical, les anticorps appartiennent surtout à la classe des IgG et les titres varient de 1/20 à 1/1000 (113) Les cellules pariétales sont très riches en mitochondries donc la présence d'anticorps contre ces dernières entraînent aussi un marquage de ces cellules. L'interprétation est difficile lorsque les deux types d'autoanticorps coexistent dans le sérum(115). Les cellules sont fortement marquées avec le sérum de patients atteints de cirrhose biliaire primitive qui renferme des anticorps anti- mitochondries M2 réagissant avec la pyruvate – déshydrogénase .La fluorescence a un aspect fortement granulaire et uniformément réparti dans le cytoplasme ,contrairement à l'aspect fortement granulaire et uniformément réparti dans le cytoplasme ATPase H+K+ ,qui est flocunneux et plus intense au niveau du pole apical de la cellule pariétale(Figure 47) (113).

les anticorps dits hétérophiles se fixent sur les cellules pariétales de l'estomac de rat .la fluorescence est homogène et recouvre l'ensemble du cytoplasme, ainsi les anticorps hétérophiles se reconnaissent aussi par leur fixation sur la bordure en brosse des tubes rénaux proximaux et des canalicules biliaires de foie. (Figure 42) 113

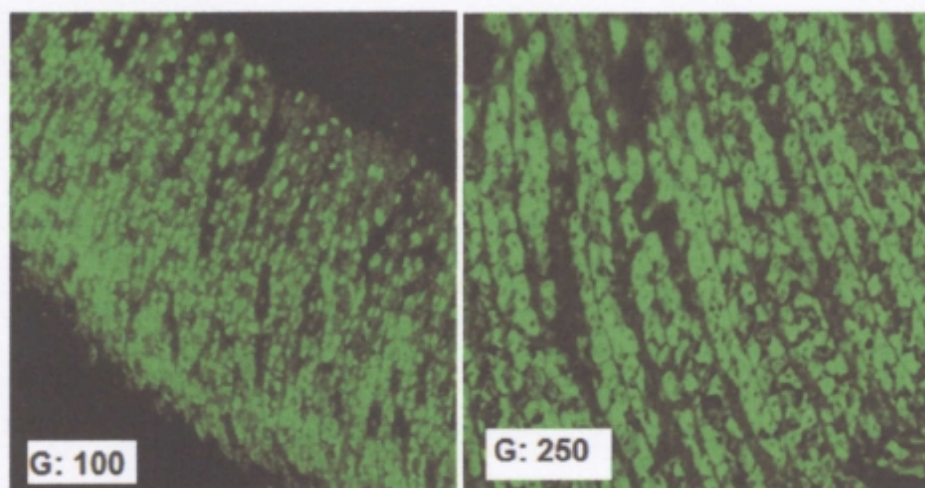


Figure 47 : Fluorescence des anticorps anti-cellules pariétales sur coupe de muqueuse gastrique de rat (120).

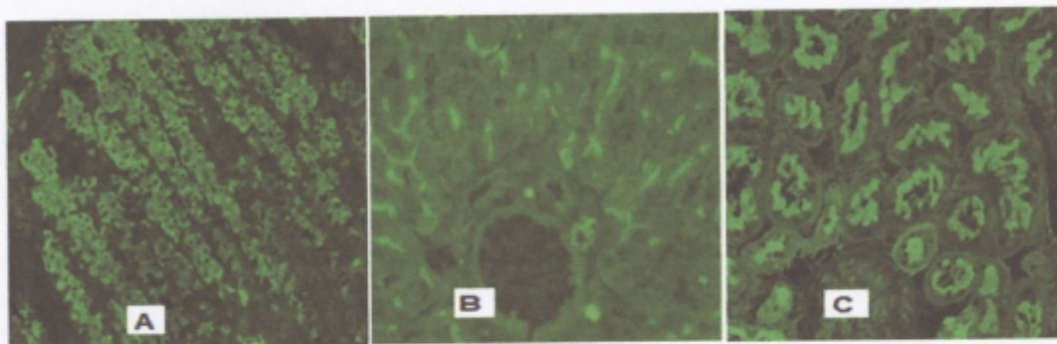


Figure 48: Anticorps hétérophiles sur cellules de l'estomac de rat(A), rein de rat(B), foie de rat(C) (121).

IV.2.2.1.2.4/Intérêt :

L'anticorps anti-cellules pariétale est présent chez plus de 75 % des bierrmériens, .IL se rencontre également dans d'autres affections auto-immunes : surrénalite, thyroïdite, certains cas d'anémies ferriprives ou de diabète insulino dépendant, ainsi que chez les sujets présentant une inflammation ou une atrophie gastrique, en dehors de toute anémie pernicieuse (122) .

Pour les gastrites, la fréquence des anticorps anti-cellules pariétales dépend du stade d'évolution de la gastrite, c'est-à-dire du degré d'atteinte de la muqueuse du fundus .elle est seulement de 20% dans la gastrite superficielle, mais atteint 50% à 80% en cas d'atrophie, ils peuvent cependant faire défaut dans l'atrophie terminale .Ce qui correspond à la disparition total des cellules pariétales, atrophie qui réduit la stimulation antigénique (122) .

Les auto-anticorps ACP offrent donc un reflet de l'inflammation et de l'atrophie gastrique(122).

NB :

- ✓ Il est important de faire la recherche en IFI aussi bien sur coupes d'estomac de rat que sur coupes du rein de rat, ceci permet d'éliminer les Ac anti-M (positive sur les deux coupes alors que les anti-cellules pariétales sont négatives sur les coupes de rein (132).
- ✓ Des tests immuno-enzymatiques (ELISA et immunodot) utilisant de l'ATPase H⁺/K⁺ purifiée d'estomacs animaux permettent de confirmer la présence d'anticorps anti-cellules pariétales.

Tableau VII :Méthodes de dosage et spécificité des auto-anticorps de la gastrite A

Auto-anticorps	Méthodes de recherche	Spécificité
L'anticorps anti- cellules pariétale	IFI sur estomac de rat	plus de 75 % des biermériens
Facteur intrinsèque	ELISA/dot	

IV.2.2.2/La maladie cœliaque (l'intolérance au gluten) :

IV.2.2.2.1/ Définition :

La maladie cœliaque est une entéropathie auto-immune résultant d'une intolérance au gluten chez un sujet génétiquement prédisposé ; des facteurs d'environnement en particulier viraux peuvent aussi jouer un rôle important (voir Annexe VIII) (132). Cette maladie est caractérisée par une atrophie villositaire de l'intestin grêle responsable d'un syndrome de malabsorption. Le diagnostic de certitude repose sur une biopsie duodénojunale révélant une atrophie villositaire totale ou subtotale associée à une hypertrophie cryptique. L'expression clinique ainsi que l'atrophie régressent sous l'effet d'un régime préventif(134). A coté de la forme infantile aiguë avec malabsorption et insuffisance nutritionnelle profonde, on trouve des formes frustes, cliniquement silencieuses, qui peuvent s'observées chez l'adulte. Cette intolérance peut également être observée au niveau d'autres organes que le tractus digestif, en particulier la peau (dermatite herpétiforme) (113)

IV.2.2.2.2/ Les marqueurs sérologiques :

Les marqueurs sérologiques ont un grand intérêt dans cette pathologie, cliniquement très polymorphe, pour aider à exclure ou à confirmer le diagnostic.

Quatre types d'anticorps peuvent être recherchés dans la maladie cœliaque :

les aAcs anti-gliadine, les aAcs anti-endomysium ; et les aAcs anti-réticuline et, plus récemment, les aAc anti-transglutaminase. Ce sont les anticorps de classe IgA qui sont les plus sensibles pour le diagnostic de la MC. L'absence de déficit en IgA devra être contrôlée par un dosage d'IgA totales. En cas de déficit en IgA (2 à 3 % des MC sont déficitaires en IgA(135), la recherche d'aAcs spécifiques de type IgG sera alors effectuée (136).

Ces marqueurs permettent un **dépistage** de la maladie, une diminution du nombre de biopsies sans totalement les supplanter. De plus, la mise sous régime sans gluten fait disparaître ces anticorps, leur conférant ainsi un intérêt pour **le suivi** des patients (137).

IV.2.2.2.1/ Autoanticorps anti-endomysium (AAE).

Les AAE réagissent avec la substance intermyofibrillaire du muscle lisse et plus précisément avec les protéines non collagèneuses produites par les fibroblastes ce qui correspond à une structure voisine de réticuline. Les concentrations les plus élevées en Ag endomysien sont observées dans la partie inférieure de l'œsophage de primates(138).

IV.2.2.2.1.1/ La recherche des AAE :

Ces aAcs sont recherchés par la technique d'immunofluorescence indirecte dont le principe et le protocole sont ceux de la méthode générale.

IV.2.2.2.1.1.1/ Les substrats utilisés :

Les substrats antigéniques qui peuvent être utilisés sont : soit des coupes au deux tiers inférieur d'un **œsophage de primate (de singe)** (substrat de référence mais il est relativement couteux) soit des coupes à congélation (4 μ m) non fixées de **cordon ombilical humain** (facilement disponible avec une meilleure sensibilité des tissus humains par rapport au singe). Ce substrat a été développé afin de préserver les primates. Cependant, la lecture et par conséquent l'interprétation sont beaucoup plus difficiles sur cordon ombilical(137).

IV.2.2.2.1.1.2/ Dilution du sérum :

La détection des anticorps est effectuée sur des sérums dilués au **1/20**.

IV.2.2.2.1.1.3/ Le conjugué :

La recherche d'anticorps de classe IgA est effectuée en utilisant un anti-sérum monospécifique anti- chaîne lourde α humaine. En cas de déficit sélectif en IgA, un anti-sérum monospécifique anti-chaîne lourde γ humaine sera utilisé(139).

IV.2.2.2.1.1.4/ Aspects de fluorescence :

La présence d'anticorps anti-endomysium est révélée par (137):

- une fluorescence en « nid d'abeille » de la muscularis mucosae (couche musculaire lisse) sur coupe d'œsophage de singe ; comme le montre la figure 49.
- une fluorescence en rayons de miel autour des cellules musculaires lisses des vaisseaux du cordon ombilical.

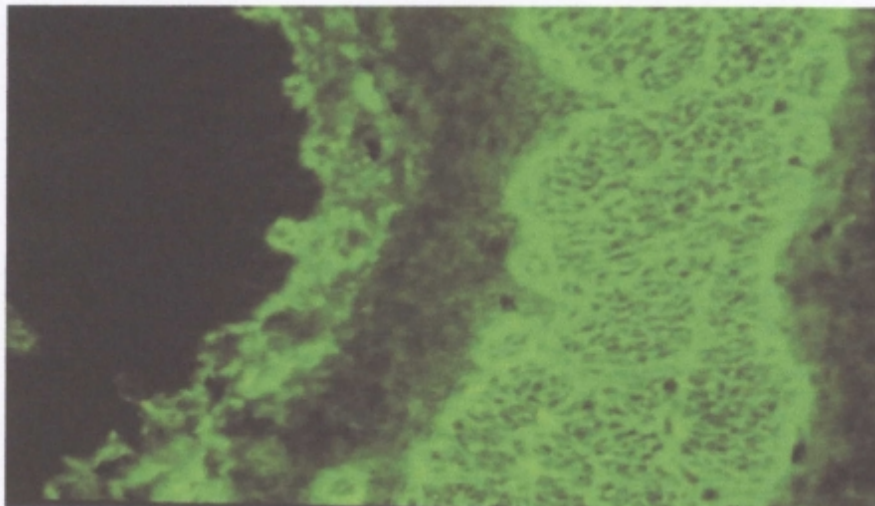


Figure 49 :Anticorps antiendomysium par immunofluorescence indirecte sur œsophage de singe (x200) (140).

IV.2.2.2.1.1.5/ Intérêt des autoanticorps antiendomysium (AAE) :

La sensibilité et la spécificité des IgA et des IgG antiendomysium pour la maladie cœliaque sont élevées mais varient selon les études : la sensibilité et la spécificité des IgA est de 85 à

100 % ou 95 à 100 %, plus faible pour les IgG (141,142). Il faut de nouveau attirer l'attention sur l'éventualité d'un déficit en IgA.

Il semble que les AAE soient le marqueur le plus sensible et le plus spécifique pour le **dépistage** de la maladie cœliaque, surtout chez les personnes âgées. En revanche, leur intérêt semble moindre pour des cohortes d'enfants de moins de 2 ans.

Les AAE ont également un intérêt **pronostique** puisqu'ils disparaissent si la compliance au régime est bonne.

IV.2.2.2.2/ Auto-anticorps anti-réticuline (AAR) :

IV.2.2.2.2.1/La recherche des AAR :

Les AAR sont recherchés par une technique standard d'immunofluorescence indirecte (137,139).

IV.2.2.2.2.1.1/ Les substrats :

Les substrats sont des coupes à congélation (4 µm) non fixées de **rein, foie, et estomac de rat** (coupes préparées au Laboratoire) .

IV.2.2.2.2.1.2/ La dilution :

Les sérums sont dilués au **1/50**.

IV.2.2.2.2.1.3/ Le conjugué :

La révélation est faite par un anti-sérum monospécifique anti-chaîne α humaine marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine car les AAR sont principalement de classe IgA. En cas de déficit sélectif en IgA un anti-sérum monospécifique anti-chaîne lourde γ humaine est utilisé.

IV.2.2.2.2.1.4/ Les aspects :

Seuls les Ac antiréticuline d'aspect « R1 » sont spécifiques de la maladie cœliaque. Leurs caractéristiques sont les suivantes (148) :

- ✓ sur coupe de foie de rat, une fluorescence entourant les veines à la limite des hépatocytes comme le montre la **figure 50A**;
- ✓ Sur coupe de rein, on observe un marquage autour des tubules et des glomérules (**fig 50B**);
- ✓ sur l'estomac, une fluorescence entre les cellules pariétales gastriques est observée.

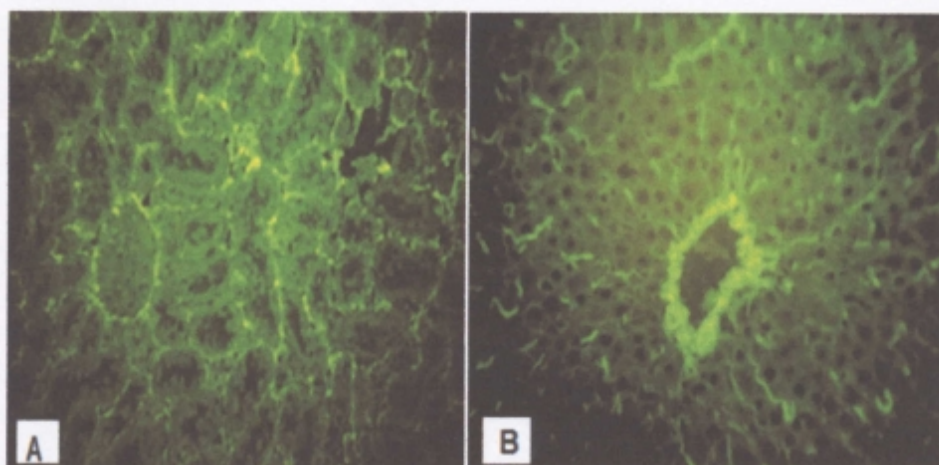


Figure 50 : Autoanticorps anti-réticuline sur foie de rat (A) et sur rein de rat (B) (149).

IV.2.2.2.2.1.5/ Intérêt des AAR :

La sensibilité des AAR varie selon les études entre 40 et 60 % alors que leur spécificité est très bonne, variant de 97 à 100 % .Du fait de leur manque de sensibilité, la recherche des AAR par IFI ne peut donc pas servir de test de dépistage. Il semblerait que la présence d'AAR soit associée à une atrophie villositaire. Chez des sujets traités, les anticorps disparaissent plus lentement que les autres, traduisant probablement une guérison de la muqueuse(148).

IV.2.2.2.2.3/ Auto-anticorps anti-gliadine (AAG) :

IV.2.2.2.2.3.1/Techniques de recherche des AAG:

Les AAG sont recherchés essentiellement par le test ELISA, où la gliadine purifiée immobilisée sur les microplaques est utilisée.

Ainsi les AAG (IgA et IgG) peuvent être détectés par La technique de *Dot blot*et l'IFI sur coupe de rein de rat. Cependant cette dernière (IFI) est moins sensible que le test ELISA, pour cela la recherche des AAG par IFI ne peut donc pas servir de dépistage.

IV.2.2.2.3.2/Intérêt des AAG:

L'intérêt diagnostique des AAG au cours de la MC varie considérablement selon les études. En effet, leur sensibilité et spécificité oscillent pour les IgG respectivement de 55 à 100 % et 50 à 100 %, et pour les IgA de 68 à 90 % et 42 à 100 % (147).

Certaines études tendent à montrer que l'isotype IgA serait retrouvé dans 100 % des formes avec atrophie villositaire et donc pourrait être un meilleur marqueur des formes typiques chez l'enfant de moins de 2 ans.

Si chez l'adulte ou chez l'enfant de plus de 2 ans, le marqueur anti-gliadine offre moins d'intérêt, il conserve cependant une valeur prédictive. En effet, lors d'un régime bien suivi, les AAG d'abord IgA puis IgG sont les premiers marqueurs sérologiques à disparaître et à réapparaître si la compliance au traitement est moins bonne (147).

IV.2.2.2.4/ Autres :

Anticorps antitransglutaminase tissulaire (tTG) :

Les anti-tTG sont également retrouvés dans le sérum des patients atteints de maladie cœliaque. ces anticorps sont recherchés par les techniques suivantes(150) :

- Elisa.
- Technique radio-immunologique.
- Dot blot.

IV.2.2.2.1.2/ Eléments à prendre en compte dans l'interprétation des marqueurs sérologiques :

Déficits en IgA :

Un déficit en IgA, non diagnostiqué, peut entraîner des résultats faussement négatifs des anticorps de classe IgA. Ce déficit se retrouve chez 1,7 % à 2,6 % des patients atteints de maladie cœliaque. Ainsi, le risque de développer une MC est 10 à 20 fois plus élevé chez les

patients présentant un déficit en IgA. C'est pourquoi, il est important de dépister une maladie cœliaque chez les patients atteints de déficit en IgA.

En cas de déficit en IgA, les anticorps spécifiques de classe IgA ne sont pas produits. L'alternative sérologique sera la recherche d'anticorps de type IgG. Les IgG anti-endomysium sont un bon marqueur, mais de réalisation technique délicate. Les IgG antigliadine manquent de spécificité. Les IgG antitransglutaminase sont le marqueur à réaliser en cas de déficit en IgA. Suivant la technique utilisée, la sensibilité varie entre 75 % et 95 % et la spécificité entre 94 % et 100 % (145).

□ **Quantité de gluten consommée :**

Les marqueurs sérologiques peuvent être faussement négatifs ou abaissés si la quantité de gluten consommée est très basse au moment du diagnostic. Une réintroduction du gluten dans l'alimentation est conseillée pour réaliser un diagnostic de certitude (146)

□ **Traitement immunosuppresseur :**

Les anticorps seront négatifs. Une biopsie est nécessaire si la clinique est évocatrice(146).

IV.2.2.2.2.1.3/ La valeur diagnostic des auto-anticorps dans la maladie cœliaque :

Les AAE de classe IgA constituent un marqueur très intéressant pour le diagnostic de la MC de l'adulte (sensibilité de 97%-100% et spécificité de 98-99%) et de l'enfant de plus de 2 ans (sensibilité de 86% et spécificité de 100%) et peuvent servir de dépistage de la MC chez la population à risque (voire Annexe III), pour cette raison ils ont été longtemps considérés comme la référence pour le diagnostic de la MC pour l'adulte et l'enfant de plus de 2 ans. Leur dosage a cependant l'inconvénient d'être coûteux et complexe car il requiert des préparations d'œsophage de singe ou de cordon ombilical. En outre l'IFI est en partie subjective et sa qualité peut fortement varier d'un laboratoire à l'autre. Un nouveau test, le dosage des ATG est désormais disponible sous forme de kit ELISA en réalisation simple et reproductible ; car les ATG ont une excellente concordance avec les AAE).

Cependant la sensibilité des AAE chez l'enfant de moins de 2 ans est strictement très faible (57%), par contre elle est de 86% pour les AAG. Donc, ce dernier représente le meilleur marqueur des formes atypiques chez l'enfant de moins de 2 ans (148).

En ce qui concerne les AAR, ils sont actuellement abandonnés car leur performance diagnostique est inférieure à celle des autres tests (151).

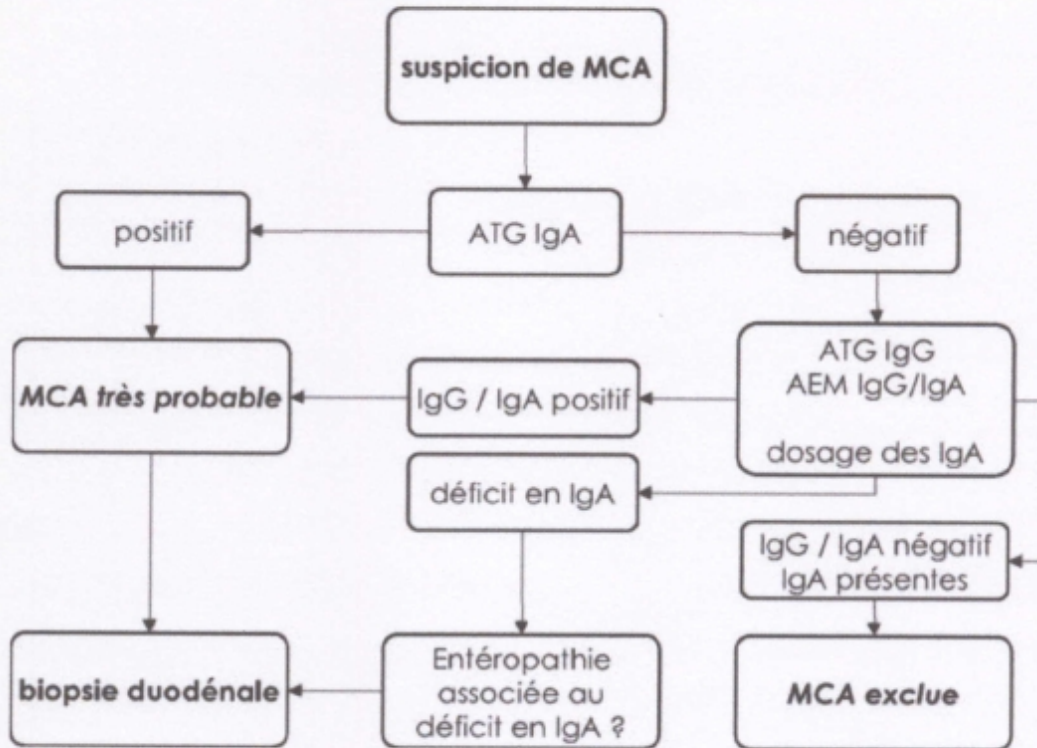


Figure 51 : Maladie cœliaque de l'adulte : algorithme de diagnostic (151).

Tableau VIII : Les marqueurs sérologiques de la maladie cœliaque .

Auto-anticorps	Méthode de recherche	la sensibilité	la spécificité
<i>Autoanticorps anti- endomysium (AAE)</i>	IFI sur œsophage de primate ou cordon ombilicale	IgA : 85 à 100 % IgG : plus faible	IgA : 95 à 100 % IgG : plus faible
Auto-anticorps anti-réticuline (AAR)	IFI sur coupes non fixées de rein, foie, et estomac de rat	Entre 40 et 60 %	De 97 à 100 %
Auto-anticorps anti-gliadine (AAG)	ELISA /dot/ IFI sur coupe de rein de rat.	IgG 55 à 100 % IgA 68 à 90 %	IgG 50 à 100 % IgA 42 à 100 %
Anticorps antitransglutaminase tissulaire (tTG)	ELISA /DOT	95%	95%

IV.2.3/Maladies rénales auto-immunes Syndromes de Goodpasture (SGP) :

Une proportion importante de néphropathies, notamment des glomérulonéphrites sont d'origine immunologique. La plus connue mais aussi la plus rare est la maladie ou le syndrome de Goodpasture (116).

IV.2.3.1/Définition de SGP :

Le syndrome de Goodpasture associe une glomérulonéphrite nécrosante avec prolifération extra-capillaire pure c'est-à-dire sans prolifération endo-capillaire associée et une pneumopathie marquée par des hémoptysies par hémorragies intra-alvéolaires.il constitue une maladie auto-immune due à des auto-anticorps dirigés à la fois contre des déterminants antigéniques de la membrane basale glomérulaire et la membrane basale des alvéoles pulmonaires(152).

IV.2.3.2/Diagnostic :

Le diagnostic du syndrome de Goodpasture repose sur la découverte en immunofluorescence d'une fixation linéaire d'IgG ,très rarement d'IgA, sur la membrane basale glomérulaire.mais il est beaucoup plus facile de rechercher directement ces anticorps dans le sérum .Ceux-ci peuvent être mis en évidence par immunofluorescence indirecte sur coupe de rein et par dosage Elisa .L'analyse des protéines d'extraction des membranes basales a permis d'établir que les anticorps de la maladie de Goodpasture réagissent avec un déterminant antigénique présent sur le collagène IV ,constituant essentiel de la membrane basal glomérulaire et exactement le contituant M2 du collagène IV.(152)

IV.2.3.1.3/Immunofluorescence indirecte et auto- anticorps anti-membrane basale glomérulaire :

IV.2.3.3.1 /Le substrat :

Les anticorps anti-membrane basale glomérulaire se recherchent en routine par IFI sur coupe de rein .Il faut impérativement utiliser du rein de primate, les anticorps anti-M2 ne

réagissant pas avec la membrane basale glomérulaire des autres espèces. la coupe doit d'autre part être préalablement soumise à un traitement par l'urée pour scinder la membrane et permettre l'accessibilité des anticorps à l'antigène de la maladie Goodpasture .Cette opération consiste à immerger la coupe de rein de primate dans une solution 6M D'urée, équilibrée à Ph 3,5 par un tampon glycine HCL 0 ,1M .Après une incubation de 30 minutes, la coupe est soigneusement rincée en solution tampon phosphate puis incubée avec le sérum.(152)

IV.2.3.3.2 /La dilution :

La dilution est de 1/50(152).

IV.2.3.3.3/Aspect :

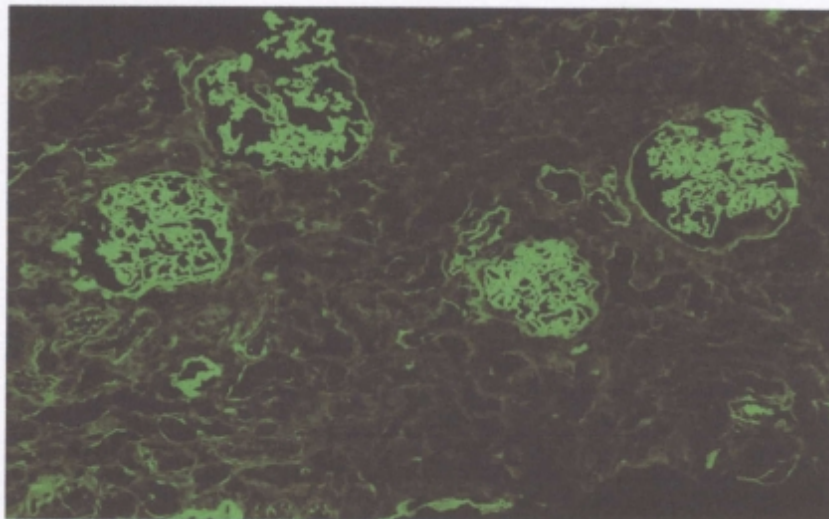


Figure 52 : Fixation linéaire des IgG sur les membranes basales glomérulaire sur coupe de rein de primate préalablement traitée par l'urée (155).

IV.2.3.3.4/Intérêt :

Ces anticorps sont le plus souvent des IgG et exceptionnellement des IgA ou IgM
Les auto-anticorps (auto-Ac) anti-membrane basale glomérulaire (MBG) dirigés contre le collagène de type IV sont spécifiques du syndrome de Goodpasture (SGP). Ce syndrome se caractérise par un syndrome pneumo-rénal hémorragique qui peut être rapidement fatal en l'absence de traitement. D'où la nécessité de disposer d'un examen sensible spécifique et

rapide à réaliser telle que la recherche d'anti MBG , immunofluorescence indirecte concrétise ce but (154).

Devant un syndrome pneumo-rénal tout venant, la recherche des anti-MBG est rarement positive et cette positivité confirme un SGP pour quatre d'entre eux (25%).

Le taux des anticorps est généralement assez bien corrélé à l'activité de la maladie et permet d'adapter la thérapeutique(153).

La détection des auto-Ac anti-MBG par IFI s'est progressivement imposée comme une étape clef du diagnostic de SGP. D'ailleurs, cette recherche est facilitée par l'excellente spécificité et sensibilité des dosages immunologiques qui utilisent comme antigène la chaîne α_3 du collagène de type IV soit sous forme recombinante soit sous forme purifiée (154)

Remarque :

La détection des anti-MBG s'associe avec une positivité inconstante des ANCA de type p-ANCA/MPO ce qui doit faire rechercher une vascularite associée et de façon inattendue avec deux autres cibles glomérulaires : l'alpha-actinine et la laminine(154).

IV.2.4/Les endocrinopathies auto-immunes

IV.2.4.1/Le diabète insulino-dépendant (DID):

IV.2.4.1.1/Définition :

Comme toutes les maladies auto-immunes le DID est une pathologie multifactorielle se développant sur un terrain génétiquement prédisposé et probablement sous l'effet des facteurs environnementaux (156).mais les recherches indiquent clairement la responsabilité des mécanismes immunologiques dans la destruction des cellules β des îlots de Langerhans, mais l'événement initiateur du dérèglement reste inconnu (157) .

IV.2.4.1.2/Les marqueurs humoraux :

Dès la phase préclinique du DID divers aAc, dirigés contre des Ag des cellules d'îlots de Langerhans et contre les produits de sécrétion des cellules β , sont détectables (159).

A l'heure actuelle ; les marqueurs immunologiques recherchés en routine sont les islets cell antibodies (ICA),correspondant aux premiers aAc mis en évidence en 1974 (160).d'autre aAc

dirigés contre l'insuline et plus récemment contre une protéine de 64 KDa ont été identifiés. ces aAc sont, avec les ICI, les aAc associés au DID les plus étudiés. la valeur prédictive de la survenue d'un DID de chacun de ces marqueurs humoraux reste encore trop faible, mais elle est considérablement augmentée par l'association de leur détection.

IV.2.4.1.3/ La recherche des anti-îlots par immunofluorescence indirecte :

La mise en évidence des ICA est réalisée par immunofluorescence indirecte

IV.2.4.1.3.1/ Le substrat :

Le support de recherche des ICA c'est les coupes de pancréas humain ou de primate.

IV.2.4.1.3.2/La dilution et cojugué :

Le sérum est dilué au 1/3, dans un tampon composé d'albumine bovine (1 g), de Tween20 (0,05 g), d'aprotinine (10 000 U.), d'azide de sodium (0,1 g) pour 100 ml de PBS (156).

Pour atteindre une sensibilité maximale, le sérum est incubé avec la coupe durant 18 h (156,157).L'antiglobuline fluorescente est une *anti-IgG* humaine de haute avidité(161).

IV.2.4.1.3.3/ Aspect :

Sur coupe de pancréas humain ou de primates on peut mettre en évidence des Ac marquant le cytoplasme des îlots de Langerhans. Ces Ac reconnaissent généralement toutes les cellules (β à insuline, α à glucagon, δ à somatostatine, et PP à polypeptide pancréatique) la réactivité avec les cellules β est parfois plus intense (*figure 53*). Un marquage exclusif des cellules α localisé essentiellement en périphérie des îlots de Langerhans, est parfois observé avec certains sérums mais n'est pas spécifique au DID (158).

IV.2.4.1.3.4/ Intérêt :

Islet cell antibodies (IAC) sont souvent associés au DID (diabète de type 1). La sensibilité de l'IFI est environ 80 % et la spécificité est de 95 %(162).

Cependant, la recherche des anti-îlots par immunofluorescence indirecte doit être complétée par l'étude des anticorps spécifiques de divers constituants des cellules β : la glutamate-décarboxylase (GAD), les tyrosine-phosphatases IA-2 et phogrin, la Glim 38, la carboxypeptidase, l'insuline, les gangliosides et les sulfatides (voir tableau), parce que la valeur prédictive de la survenue d'un DID de chacun de ces anticorps pris isolément est faible, mais elle est considérablement augmentée par leur association(171).

Fluorescence des auto-anticorps anti- îlots de Langerhance sur coupe de pancréas de singe (159).

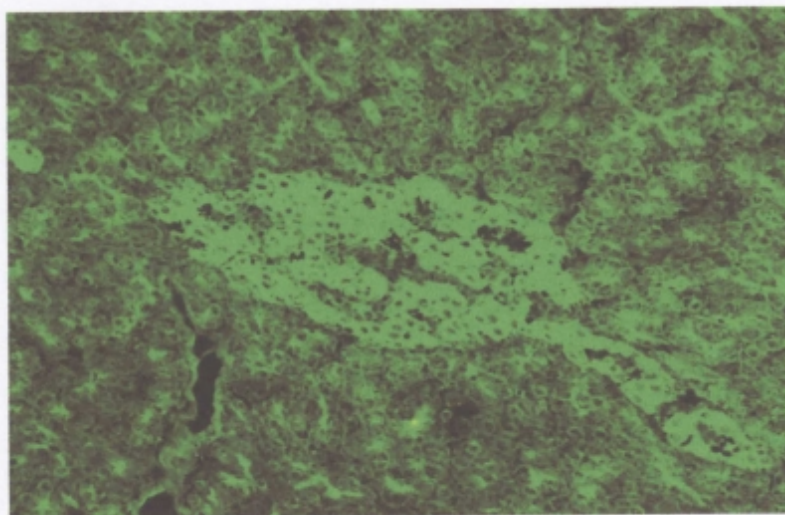


Figure 53: Fluorescence des auto-anticorps anti- îlots de Langerhance (ICA) sur coupe de pancréas de singe (165).

Tableau IX: Auto-anticorps associés au diabète de type I (164).

<i>Antigène cible</i>	<i>Nature biochimique</i>	<i>Technique</i>	<i>Fréquence dans le DID (%)</i>
ICA	Antigènes cytoplasmiques des îlots pancréatiques	Immunofluorescence indirecte	70-90
GAD 65	Glutamate-décarboxylase	Radio-immunoprécipitation	65-90
INSULINE	Hormone	Radio-immunoprécipitation	20-70
IA2	Protéine-tyrosine	Radio-immunoprécipitation	40-80
PHOGRIN	phosphatase	Radio-immunoprécipitation	30-60
GLIMA	Protéine-Tyrosine-	Radio-immunoprécipitation	19-35
GANGLIOSIDES GM2-	Phosphatase (IA2b) Protéine membranaire des granules sécrétoires	Chromatographie	70
GANGLIOSIDES GT-3	Ganglioside spécifique ¹ du pancréas Trisialoganglioside	Chromatographie	30
SULFATIDES	Galactocérobroside-3-sulfate	Chromatographie	88
CPH 25	Carboxypeptidase-H	Radio-immunoprécipitation	25

IV.2.4.2.3.1/ Maladies auto-immunes de la thyroïde :

IV.2.4.2.3.1.1/ Généralités :

Les maladies auto-immunes de la thyroïde comprennent des pathologies allant de l'hypothyroïdie à l'hyperthyroïdie, du goitre à l'atrophie totale du corps thyroïde. Ces manifestations sont la résultante d'auto-anticorps inhibiteurs ou activateurs de fonction thyroïdienne. L'apparition des anticorps peut précéder de plusieurs mois l'apparition des anomalies hormonales et cliniques d'où leur intérêt pour le diagnostic des thyroïdites asymptomatiques du sujet âgé (172).

IV.2.4.2.3.1.2/ Anticorps anti-thyroïde :

IV.2.4.2.3.1.2.1/principales variétés :

En pratique courante, trois types d'anticorps anti-thyroïde sont recherchés : ils sont dirigés soit contre le récepteur de la TSH, soit contre la **thyropéroxydase (TPO)**, soit contre la **thyroglobuline (Tg)**.

a.Anticorps anti-thyropéroxydase (TPO) :

La TPO est une protéine transmembranaire localisée essentiellement au pôle apical des thyrocytes. C'est une enzyme clé de la synthèse des hormones thyroïdiennes . Les anticorps anti-TPO sont essentiellement des **IgG**. Ils reconnaissent un nombre limité d'épitopes ; ces anticorps ont longtemps été désignés par le terme d'anti-microsomes thyroïdiens(161).

b.Anticorps anti- thyroglobuline (Tg) :

La thyroglobuline (Tg) est une macro-molécule (660 kDa) qui sert de support à la synthèse des hormones thyroïdiennes. Produite uniquement par les thyrocytes, elle est également retrouvée dans la substance colloïde dont elle est le constituant essentiel.

Les anti-Tg ont été les premiers auto-anticorps anti-thyroïde identifiés par immunofluorescence indirecte. Ce sont surtout des **IgG**. Ils n'ont pas d'effet cytotoxique et ne sont pas responsables de pathologies transitoires chez le nouveau-né (161).

IV.2.4.2.3.1.2.2/Techniques de détection :

IV.2.4.2.3.1.2.2.1/Immunofluorescence indirecte :

Les anticorps anti-Tg et anti-TPO ont été mis en évidence initialement par immunofluorescence indirecte.

IV.2.4.2.3.1.2.2.1.1/Le substrat :

Le substrat utilisé, c'est des coupes au cryostat de thyroïde humaine ou de primate (161).

IV.2.4.2.3.1.2.2.1.2/La dilution :

Le sérum est dilué au 1/10^{ème} (166).

IV.2.4.2.3.1.2.2.1.3/Aspect :

Les anti-Tg marquent fortement la colloïde est la substance qui remplit les vésicules thyroïdiennes et qui contient les produits de sécrétion des cellules (Figure 55), alors que les anti-TPO donnent un marquage homogène du cytoplasme cellules des follicules thyroïdiens (161) (Figure 54).

Immunofluorescence indirecte sur coupe de thyroïde de singe fixée à l'acétone (167,161).

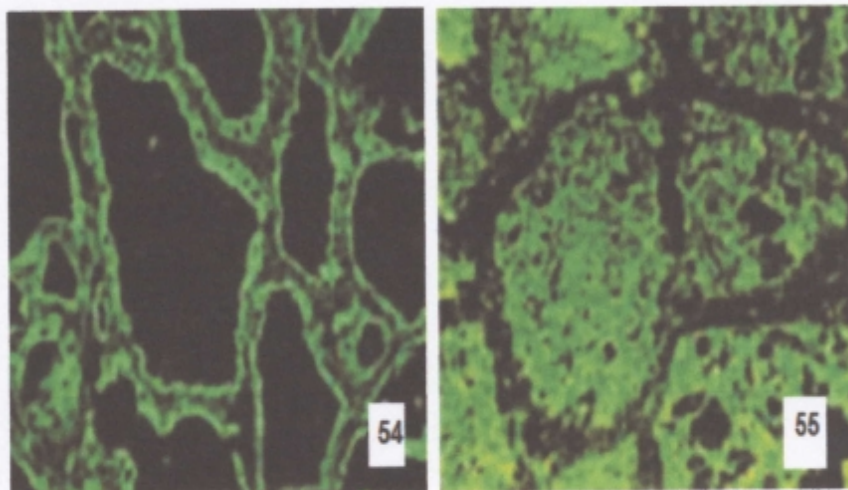


Figure 54 : marquage du-cytoplasme(anti-TPO). Figure 55: marquage de la colloïde (anti-Tg)(161).

IV.2.4.2.3.1.2.2.1.4/Intérêt des anti-TPO et anti-Tg :

Les aAc anti-TPO sont retrouvées dans l'hypothyroïdisme auto-immun (l'hypothyroïdite d'Hashimoto et le myxœdème primitif) ($\approx 100\%$), dans la maladie de Graves-Basedow ($\approx 75\%$).

Tandis que la spécificité des aAc anti-Tg est de 76% dans l'hypothyroïdie d'Hashimoto et 33% dans l'hypothyroïdisme (maladie de Graves-Basedow) (173).

Remarque :

Les Acs anti-récepteur de la TSH ne sont pas recherchés par immunofluorescence indirecte mais par les tests fonctionnels (161).

IV.2.4.2.3.1.2.2.2/Autres techniques :

En effet, la technique d'IFI, mal adaptée aux grandes séries, se heurte également aux difficultés d'approvisionnement en thyroïde : elle nécessite des coupes de thyroïde de primate, ou, de préférence, de thyroïde humaine. Elle est aujourd'hui peu utilisée(161).

-Les techniques d'agglutination passive : ces techniques n'étaient pas très précises, sensibles au phénomène de zone, et mal adaptées aux grandes séries(161).

-ELISA, immunochimiluminescence, immunofluorimétrie. L'immunoblot : ils sont très sensibles, sont parfois utilisés en recherche pour analyser la spécificité de ces anticorps (168).

Tableau X : Spécificité des auto-anticorps dans les thyropathies auto-immunes

Auto-anticorps	l'hypothyroïdisme auto-immun	la maladie de Graves-Basedow
Anticorps anti-thyropéroxydase (TPO) :	$\approx 100\%$	$\approx 75\%$
Anticorps anti-thyroglobuline (Tg) :	76%	33%

IV.2.4.3/Les auto-anticorps anti-parathyroïde:

IV.2.4.3.1/Introduction :

Des auto-anticorps dirigés contre le tissu parathyroïdien ont été décrits chez des patients atteints d'hypoparathyroïdie isolée ou associée à d'autres manifestations endocrines auto-immunes au cours des syndromes polyendocrininiens de type I (PEA de type I) (181).

IV.2.4.3.2/Les cibles reconnues par les auto-anticorps anti-parathyroïde :

a. Les aAc anti-parathyroïdiens reconnaissent des cibles dans **le cytoplasme** des cellules principales, non encore identifiées, mais aussi sur **la membrane** plasmique; grâce à une technique d'immunotransfert une des cibles membranaire a été identifiée c'est le récepteur sensible au calcium (CaSR) (186, 187).

En effet; la glande parathyroïde contient deux types de cellules sécrétoires de la parathormone (ou PTH) de deux sortes : les cellules principales nombreuses qui produisent la parathormone, et les cellules oxyphiles, de plus grande taille mais moins nombreuses, associées en amas (186).

b. Des aAc **anti-hormone** parathyroïdienne (aAc antiPTH) ont également été décrits (188).

IV.2.4.3.3/Autoanticorps anti-parathyroïde et IFI:

Seuls les anticorps antiparathyroïde sont recherchés par l'immunofluorescence indirecte.

IV.2.4.3.3.1/Le substrat :

Sur coupes au cryostat de parathyroïde de primate ou d'adénome parathyroïdien humain sont recherchés les les aAc anti-cellules à parathormone. La difficulté est d'obtenir du tissu correct et non de la thyroïde sans parathyroïde.

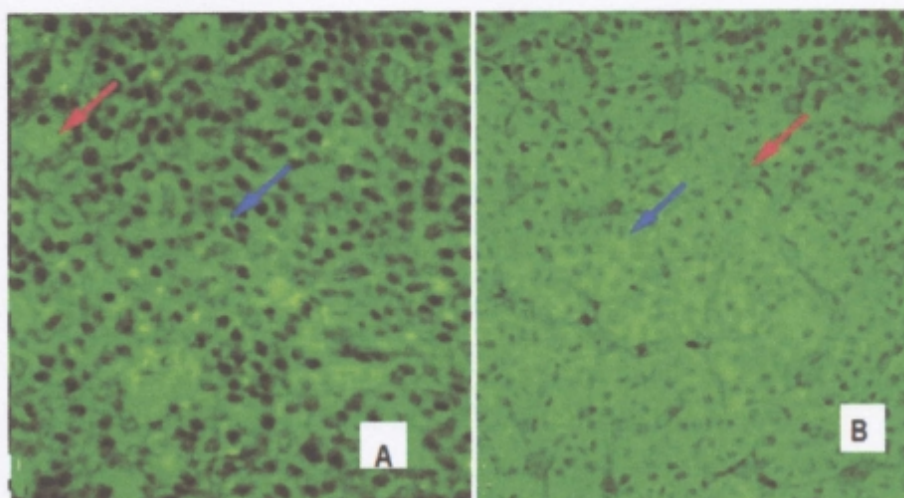
IV.2.4.3.3.2/ La dilution :

Le sérum est dilué au 1/5^{ème} (186).

IV.2.4.3.3.3/Aspect de fluorescence :

Un marquage homogène des cellules principales de la parathyroïde est observé alors que les cellules oxyphiles sont négatives (Figure 58).

Il faut toujours garder à l'esprit la présence d'auto-anticorps anti-mitochondriesM2 et anti-ribosomes, qui marquent également les cellules principales de la parathyroïde ; dans ce cas la fluorescence présente un aspect granulaire et les cellules oxyphiles sont faiblement marquées (186). Pour cela il est recommandé de rechercher ces auto-anticorps (anti-mitochondries et anti-ribosomes) sur estomac/rein de rat pour éviter une interprétation faussement positive en auto-anticorps anti-parathyroïdiens (161) (Figure 50).



Coupe de parathyroïde de primate (187).

(Flèches rouges : cellules oxyphiles – Flèches bleues : cellules principales)

Figure 58 A: Autoanticorps antimitochondries.

Figure 58 B: Autoanticorps anti-parathyroïde

IV.2.4.3.3.4/Intérêt:

La présence des aAc anti-parathyroïde peut être due à un processus auto-immun généralisé au cours des PEA mais peut être également un marqueur prédictif d'une hypoparathyroïdie malgré la faible sensibilité de ces aAc (3%) (161).

IV.2.4.4/Les auto-anticorps anti-corticosurrénale dans la maladie d'Addison auto-immune :

IV.2.4.4.1/Définition :

La maladie d'Addison est la conséquence d'une destruction progressive du cortex surrénalien, avec déficit en hormones adrénocorticales, due à la destruction des cellules productrices de ces hormones (169).

Cette affection est soit secondaire à une tuberculose, à une infection par le HIV, soit primitive. Ce dernier cas correspond à la majorité des maladies d'Addison dites "idiopathiques" dont l'origine est en fait auto-immune. En effet, des auto-anticorps (aAc) dirigés contre les glandes corticosurrénales ont été découverts dès 1957 chez la majorité des sujets atteints de maladie d'Addison (170, 174).

Il est ensuite apparu que la présence de ces auto-Ac avait une très bonne valeur diagnostique pour différencier les maladies d'Addison auto-immunes des insuffisances cortico-surrénales tuberculeuses.

IV.2.4.4.2/Les autoanticorps anti-corticosurrénale:

IV.2.4.4.2.1/Les cibles antigéniques :

a.L'antigène, cible majoritaire, est la **21-hydroxylase** qui est présente uniquement dans le cortex surrénalien, principalement dans la zone glomérulée(175,176).

d'autres cibles au sein de la cortico-surrénale ont été découvertes, correspondant à différentes enzymes des voies de la biosynthèse stéroïdienne :

b.La **17 α -hydroxylase** est située dans les zones fasciculées et réticulées de la corticosurrénale et dans les gonades et les ovaires .

c.La **cholesterol desmolase** (P450 scc) présente dans toutes les zones des cortico-surrénales, dans les gonades et le placenta (177).

IV.2.4.4.2.2/Méthodes de détection :

IV.2.4.4.2.2.1/Immunofluorescence indirecte :

Les aAc anti-corticosurrénale se recherchent essentiellement par immunofluorescence indirecte.

IV.2.4.4.2.2.1.1/Le substrat :

Les aAc anti-corticosurrénale se recherchent sur coupes en congélation non fixées de surrénale de primate.

IV.2.4.4.2.2.1.2/La dilution :

La dilution initiale du sérum est de 1/5 (177).

IV.2.4.4.2.2.1.3/L'aspect de fluorescence :

Dans la maladie d'Addison, les aAc marquent les trois zones avec une prédominance sur la zone glomérulée du fait de la localisation prédominante de la 21-hydroxylase dans cette région. (figure 55).

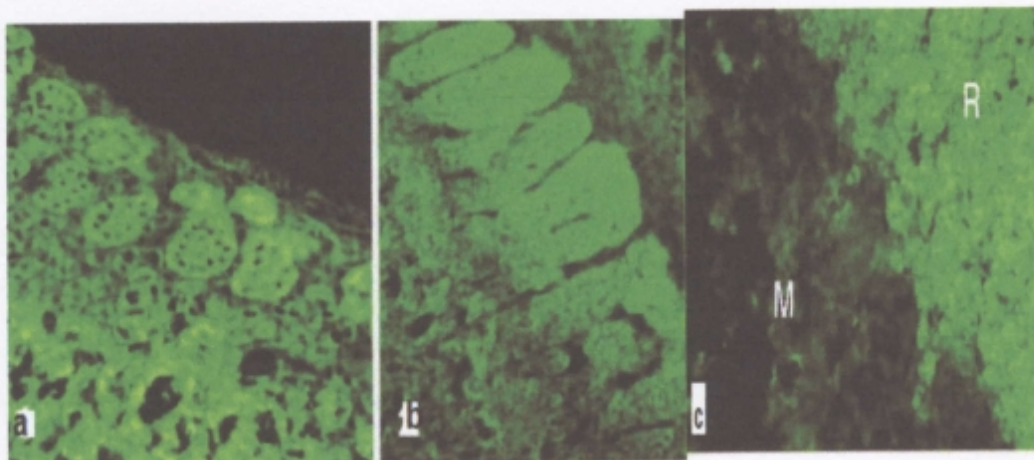


Figure 56 : Coupe de surrénale de singe(169).

- a. AutoAc fixés sur glomérulée et fasciculée.**
- b. AutoAc marquant surtout la glomérulée.**
- c. Ac fixés sur la réticulée (R) à la jonction médullaire.**

Remarque :

En présence d'Ac anti-17 α -hydroxylase et 22- desmolase (P450scc) les cellules de Leydig de testicule humain, les cellules de la thèque interne ovarienne et les cellules du syncytiotrophoblaste du placenta sont marquées de façon intense (Figure 53) (181). Les Ac anti-17 α - hydroxylase ne se localisent pas sur la zone glomérulée alors que les anti-P450 Scc la marquent (169).

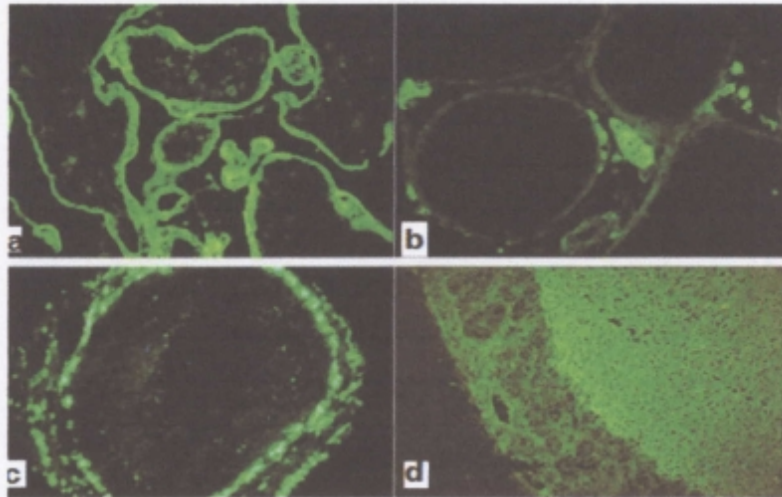


Figure 57 : Coupe de surrénale de singe(169).

a. Syncytiotrophoblaste.

b. Cellules de Leydig du testicule.

c. Thèque de l'ovaire.

d. Corticosurrénale dont la glomérulée est négative et la fasciculée marquée.

IV.2.4.4.2.2.1.4/Valeur diagnostique :

Les anticorps anti-corticosurrénal sont associés à la maladie d'Addison dans 50 à 70 % des cas .

IV.2.4.4.2.2.2/Autres techniques :

En utilisant un extrait de fraction de microsomes de surrénale humaine ou des antigènes recombinants, les trois enzymes ayant été clonées, des techniques **d'immunotransfert**, de **radio-immunoprécipitation** et **ELISA** ont été mises au point (178,179,180).

IV .2.5/Les dermatoses bulleuses auto-immunes:

IV .2.5.1/ Généralités :

Les dermatoses bulleuses auto-immunes sont un groupe d'affections caractérisées cliniquement par des lésions cutanées (et/ou muqueuses) bulleuses ou parfois vésiculopustuleuses et immunologiquement par des auto-anticorps qui vont se fixer sur les structures assurant la cohésion de l'épiderme ou de la jonction dermo-épidermique(171).

On distingue deux grands groupes :

a- Les dermatoses bulleuses auto-immunes intra-épidermiques (groupe des pemphigus) qui se caractérisent par une perte de cohésion des kératinocytes, résultant généralement de l'altération des desmosomes par les auto-anticorps.

b- Les dermatoses bulleuses auto-immunes sous-épidermiques ou jonctionnelles :

Qui se caractérisent par la perte de l'adhésion dermo-épidermique résultant d'une altération d'un composé de la jonction dermo-épidermique (171).

Le diagnostic repose essentiellement sur leurs caractéristiques cliniques, parfois spécifiques, et sur les analyses histologiques et surtout **immunopathologiques** (171). Trois types d'examen immunologiques peuvent être pratiqués : l'analyse des biopsies par immunofluorescence directe (IFD), la mise en évidence d'auto-anticorps sériques par immunofluorescence indirecte (IFI), et la caractérisation de ces auto-anticorps par immunoempreintes ou ELISA(172).

IV .2.5.2/ Autoanticorps associés aux dermatoses bulleuses et IFI :

L'IFI est la méthode de choix pour le dépistage des auto-anticorps sériques anti-peau.

a. Le substrat utilisé :

Le substrat utilisé en première intention est l'**œsophage de singe**, cependant il existe d'autres substrats qui peuvent être utilisés : langue de rat ou de bœuf, lèvre de lapin, œsophage de rat, ou peau humaine qui comportent tous un épithélium malpighien. La vessie de rat est parfois utilisée en deuxième intention(172).

b. Dilution du sérum et conjugué :

Les anticorps sont recherchés sur des sérums dilués au **1/10**, en utilisant soit un conjugué polyvalent soit en parallèle un anti-IgG (chaîne gamma) et un anti-IgA (chaîne alpha). Il est important de pouvoir détecter correctement les IgA. En effet, si ces anticorps sont en général des IgG, des IgA peuvent être isolées ou prédominer : c'est le cas dans le pemphigus à IgA et dans la dermatose à dépôt linéaire d'IgA. Il faut aussi s'assurer de la réactivité des conjugués polyvalents ou anti-IgG avec les différentes sous-classes des IgG. En effet, dans les formes actives de pemphigus vulgaire la plupart des auto-anticorps anti-substance intercellulaire sont des IgG4, alors que chez les patients en rémission ou chez les apparentés

sains ce sont surtout des IgG1(189,190,191). Il faut rappeler également que tous ces conjugués utilisés sur des tissus de singe doivent être strictement spécifiques des immunoglobulines humaines. En effet, les conjugués classiques reconnaissent également les immunoglobulines de singe (plus de 95 % d'homologie avec les immunoglobulines humaines) présentes dans les tissus et entraînent des marquages non spécifiques (bruits de fond) importants. De tels conjugués "spécial singe", (adsorbés sur tissus de singe) sont disponibles dans le commerce (172).

c.Aspects de fluorescence sur l'œsophage de singe et interprétation :

On peut distinguer trois aspects de fluorescence correspondant aux trois groupes d'anticorps :

c.1-Les anticorps anti-membrane basale d'épithélium malpighien (ou anti-ZMB: zone de la membrane basale) donnent un marquage linéaire de la basale(Figure 59). Ils reconnaissent en fait différents constituants de la jonction dermo-épidermique (172).

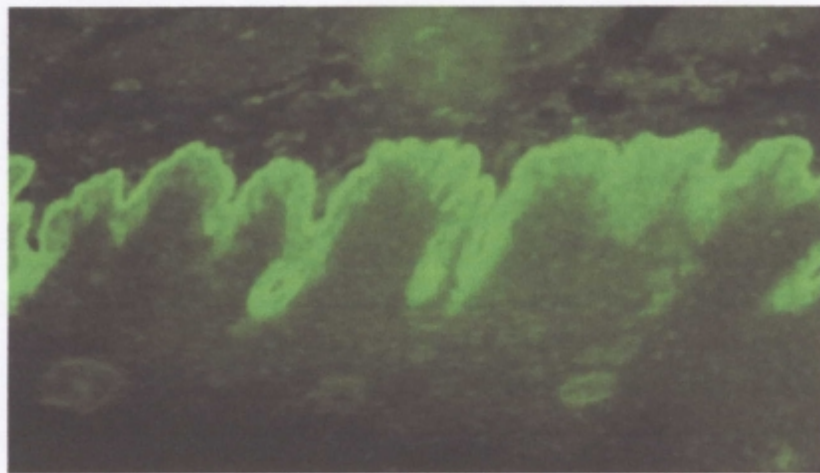


Figure59 : Anticorps anti-membrane basale par immunofluorescence indirecte sur œsophage de singe (x200) (172).

c.2-Les anticorps anti-substance intercellulaire d'épithélium malpighien (anti-SIEM ou anti-SIC : substance intercellulaire) donnent un marquage en nid d'abeille limité à l'épithélium (Figure 60). Ils sont dirigés contre différentes protéines des desmosomes ou contre des intégrines (172).

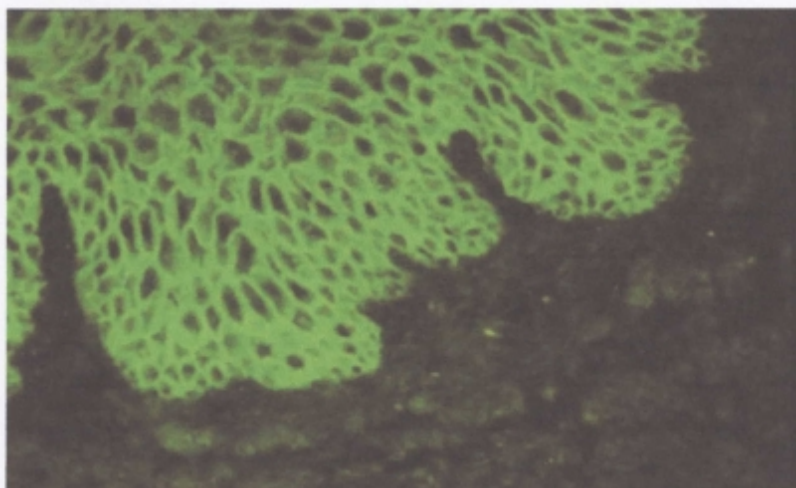


Figure 60 : Anticorps anti-substance intercellulaire par immunofluorescence indirecte sur œsophage de singe (x200) (172).

Remarque :

Des alloanticorps peuvent être la source de faux positifs dans la recherche d'anticorps anti-substance intercellulaire. En effet, la plupart des tissus de singe utilisés en IFI, en particulier les épithéliums malpighiens, expriment des antigènes AB. Aussi les sérums de patients de groupe O qui contiennent des titres élevés d'anticorps anti-A et anti-B peuvent donner un marquage en nid d'abeille de l'épithélium, comparable à celui donné par les anticorps du pemphigus (192). Il est donc recommandé de contrôler les sérums positifs après adsorption sur des globules rouges AB. Un concentré d'antigènes solubles AB, disponible dans le commerce, peut également être utilisé pour diluer le sérum (172).

c.3-les anti-endomysium (AAE) :(voir les marqueurs sérologiques de la maladie cœliaque).

d . Intérêt diagnostique des auto-anticorps :

Les aAc anti-ZMB sont surtout associés aux pemphigoïdes bulleuses, maladies dans lesquelles ils sont retrouvés dans 60 à 80 %. Alors que les aAc anti-SIEM ou anti-SIC sont surtout associés aux pemphigus, affections où on les retrouve dans 90 % des cas(172).

La sensibilité des AEA de type IgA est de 70-100% dans les dermatites herpétiformes et 100% s'ils sont associés à l'intolérance au gluten(194). mais il importe de rechercher également des IgG : elles sont moins fréquentes, mais elles peuvent être isolées en cas de déficit en IgA, associé à la maladie cœliaque dans environ 10 % des cas (172).

NB :

L'étude des auto-anticorps est d'un grand apport pour le diagnostic des maladies bulleuses auto-immunes. Si l'IFI est facile à réaliser, sa sensibilité et sa spécificité sont imparfaites. En effet, dans 30 % des cas l'IFI est négative alors que l'IFD est positive. En revanche, l'IFI peut être positive en dehors des maladies auto-immunes : c'est le cas des brûlures où des anticorps anti-substance intercellulaire peuvent être rencontrés et des toxidermies qui peuvent s'accompagner d'anticorps anti-membrane basale. Le diagnostic des maladies bulleuses auto-immunes repose donc essentiellement sur l'analyse des biopsies par IFD et la caractérisation des anticorps par immunotransfert, immunodot ou ELISA(172).

Tableau XI : Spécificité des auto-anticorps dans les dermatoses bulleuses auto-immunes .

Auto-anticorps	Spécificité	Maladie associée
aAc anti-ZMB	60 à 80 %.	pemphigoïdes bulleuses
anti-SIEM	90 %	pemphigus

IV.2.6/Maladies du système nerveux :

La possibilité d'une cause immunologique est de plus en plus évoquée dans plusieurs affections neurologiques .les maladies neuro-immunologiques ainsi créées sont très divers dans leur expression clinique ,affectant tant le système nerveux central(SNC)que le système nerveux périphérique .elle se caractérisent par la présence dans le sang d'anticorps spécifiques pour des constituants des tissus nerveux .l'auto-immunité dirigée contre la myéline du nerf périphérique s'observe dans les neuropathies sensitives associées aux gammopathies monoclonales à IgM.des auto-anticorps anti-neurones sont associés aux graves syndromes neurologiques paranéoplasiques qui touchent le système nerveux central et le système nerveux périphérique(193).

IV.2.6 .1/Les auto-anticorps :

IV.2.6 .1.1/Les anticorps anti-neurones :

Ces Acs sont classés en deux grands groupes : les Ac dirigés contre des cibles intracellulaires des neurones définissent le premier groupe. Le second groupe est composé d'Ac dirigés contre des constituants de la membrane des neurones (194).

a /Anticorps anti-neuronaux à cible intracellulaire :

Les Ac anti-neuronaux à cible intracellulaire (ACIC) reconnaissent des constituants soit nucléaires (Anticorps anti-Hu=ANNA-1 et anti-Ri=ANNA-2, Anticorps anti-Ma (Ma-1, Ma-2/Ta, Ma-3), ANNA-3, Anticorps anti-Zic, Anticorps anti-SOX) soit cytoplasmiques des neurones ou des cellules gliales (Anticorps anti-Yo ou PCA-1, PCA-2, Anticorps anti-Tr et anticorps anti-MAZ, Anticorps anti-amphiphysine, Anticorps anti-GAD, Anticorps anti-CV-2). (195) La Fig56

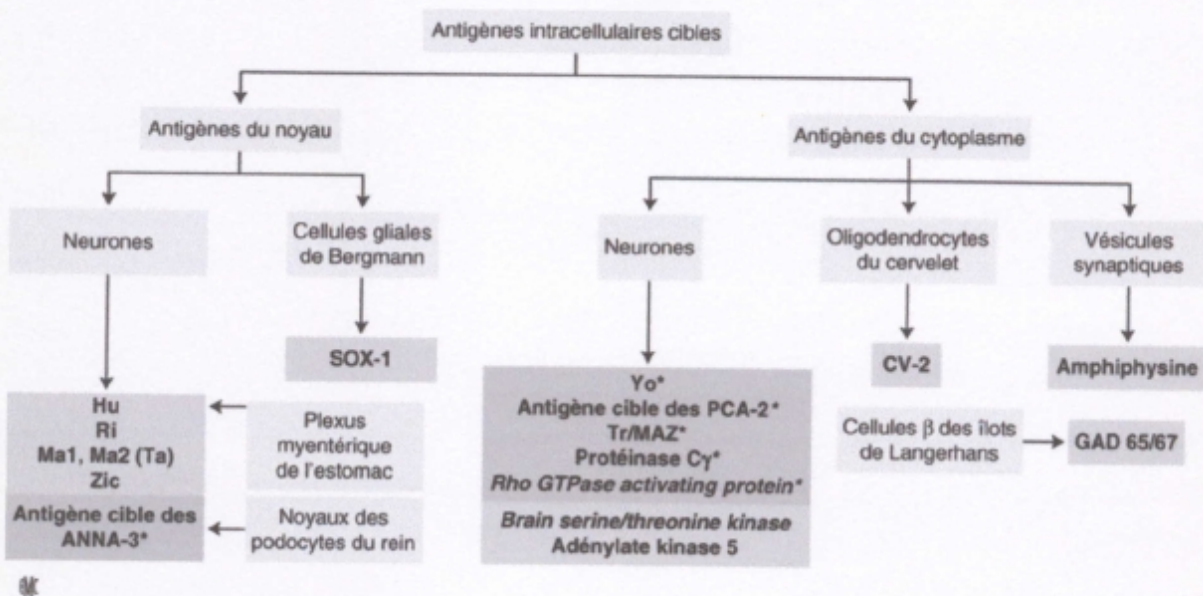


Figure 61 :

Antigènes reconnus par les anticorps antineuronaux à cible intracellulaire (195). * Les antigènes cibles sont exprimés au niveau des cellules de Purkinje. ANNA : antineuronal nuclear antibody ; SOX : sex determining region Y box ; PCA : Purkinje cell antibody ; MAZ : MYC associated zinc finger protein ; GAD : glutamate décarboxylase.

La détection des anticorps anti-neuronaux à cible intracellulaire passe d'abord par le dépistage puis l'identification . le dépistage se fait généralement par immunofluorescence indirecte sur des coupes de cerveau et/ou de cervelet de primates ou par immunohistochimie sur des coupes de cerveau et/ou de cervelet de rongeurs (rat, souris, lapin). La localisation et l'aspect de la fluorescence au niveau des différentes structures intracellulaires du cerveau et/ou du cervelet orientent vers la ou les cibles des ACIC . Les Ac anti-onconeuronaux, sont identifiés par immunodot avec des troupes commerciales utilisant des protéines recombinantes (HuD, CDR-62, CRMP-5, NOVA, amphiphysine, Ma-1, Ma-2 et SOX-1) (194,196)

b/Anticorps anti-neuronaux à cible membranaire :

Les Ac anti-neuronaux à cible membranaire (ACM) reconnaissent soit des récepteurs-canaux : récepteurs du glutamate (divisés en deux groupes : les récepteurs ionotropes associés à un canal ionique, comme les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et les récepteurs AMPA (α amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolepropionic acid), et les récepteurs métabotropes couplés aux protéines G, mGlu-R1 à mGlu-R8 18), récepteur de la glycine, récepteur du GABA, soit des canaux ioniques : canaux calciques ou canaux potassiques et protéines associées(la protéine LGI-1 (leucin-rich glioma inactivated 1, la protéine CASPR-2 (contactin-associated protein-2), la protéine contactine-2) (195).

Contrairement aux ACIC, les ACM sont directement recherchés par des techniques utilisant les Ag dont ils sont spécifiques. Ainsi les Ac anti-VGCC et anti-VGKC sont recherchés par des techniques radio-immunologiques. Lorsque la recherche d'Ac anti-VGKC est positive, la recherche des spécificités anti-LGI-1 et CASPR-2 doit être effectuée (197).

Les Ac anti-récepteurs NMDA, AMPA, GABAB et les Ac anti-LGI-1 et anti-CASPR-2 sont recherchés par immunofluorescence indirecte sur des préparations de cellules transfectées HEK-293 surexprimant l'Ag cible(195).

IV.2.6 .1.2/les anticorps anti-myélines

IV.2.6 .2/Immunofluorescence indirecte et recherche des anticorps anti-neurones :

IV.2.6 .2.1/Anticorps anti-neuronaux à cible intracellulaire :

a- Le Substrat et dilution :

La détection des anticorps anti-neuronaux est réalisée par immunofluorescence indirecte sur des coupes de cervelet de singe. D'autres coupes de tissus seront éventuellement utilisées pour l'identification de certains anticorps (coupes de pancréas, de testicule, d'estomac). Un problème se pose lorsque le sérum examiné renferme des anticorps antinucléaires classiques. Dans ce cas, il est nécessaire de les éliminer par adsorption préalable avec une suspension de foie de veau. Celle-ci est obtenue par suspension de poudre acétonique de foie de veau (SIGMA) : 1 g dans 10 ml de tampon PBS-Tween 20(0,05 g/100) et sonication. Le sérum est dilué au 1/10e dans cette suspension et laissé en contact au moins une heure. Après centrifugation, le surnageant est déposé sur les coupes de tissu(198).

b-Aspect :

La localisation et l'aspect de la fluorescence permettent une première identification des anticorps

b.1°Anticorps anti-Hu anticorps anti-Ri :

Marquage important des noyaux des neurones (rares dans la couche moléculaire, très nombreux dans la couche granulaire) correspondant à la présence d'anticorps anti-Hu identifiés par immunodot. Les anticorps anti-Ri donnent le même aspect de fluorescence, l'immunodot permet de différencier les deux spécificités (195) figure 62

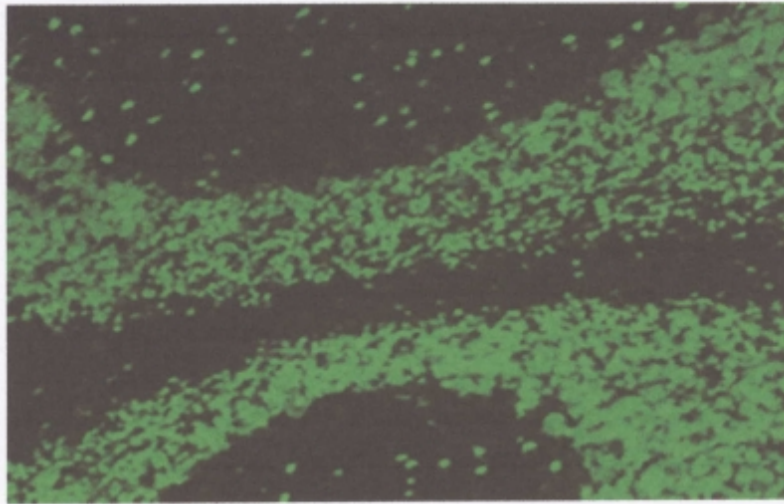


Figure 62: aspect de immunofluorescence indirecte des Anticorps anti-Hu anticorps Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe (195) .

b.2° Anticorps anti-Ma-2 :

Marquage des nucléoles des noyaux des cellules de Purkinje et des neurones des couches granulaire et moléculaire correspondant à la présence d'anticorps anti-Ma-2 identifiés par immunodot (195).

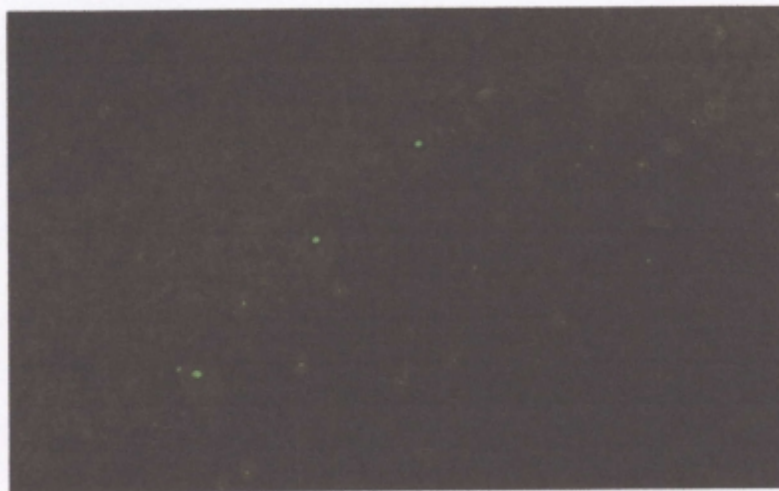
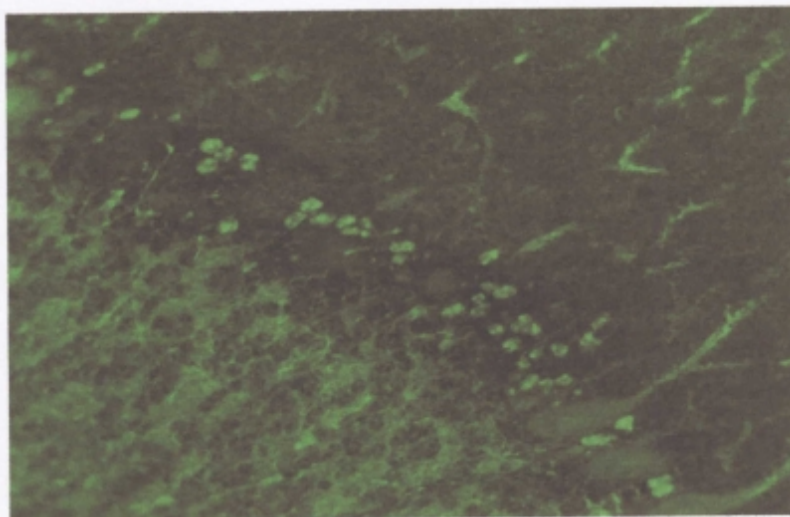


Figure 63 : Anticorps anti-Ma-2. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).

b.3° Anticorps anti-SOX-1 :

Marquage des noyaux des cellules gliales de Bergmann correspondant à la présence d'anticorps anti-SOX-1 identifiés par immunodot (195)



**Figure 64 : Anticorps anti-SOX-1 (sex determining region Y box-1).
Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195) .**

b.4° anticorps anti-yo :

La substance grise du cervelet est formée de trois zones (de haut en bas : la couche moléculaire la plus périphérique, riche en dendrites et axones et pauvre en cellules, la couche des cellules de Purkinje et la couche granulaire riche en corps cellulaires des neurones). Elle entoure la substance blanche (zone inférieure de l'image avec une petite partie de couche granulaire à droite). Il existe un marquage granulaire du cytoplasme des cellules de Purkinje correspondant à la présence d'anticorps anti-Yo confirmée par immunodot(195).



**Figure 65:Anticorps anti-Yo. ; Immunofluorescence indirecte sur coupe de
cervelet de singe(195)**

b.5° Anticorps anti-PCA-2 (Purkinje cell antibody) :

Marquage cytoplasmique des cellules de Purkinje moins granulaire que celui des anticorps anti-Yo associé à une fluorescence des dendrites s'infiltrant dans la couche moléculaire. Cet aspect correspond à celui décrit pour les PCA-2. Il n'existe pas de technique de confirmation pour cette spécificité.

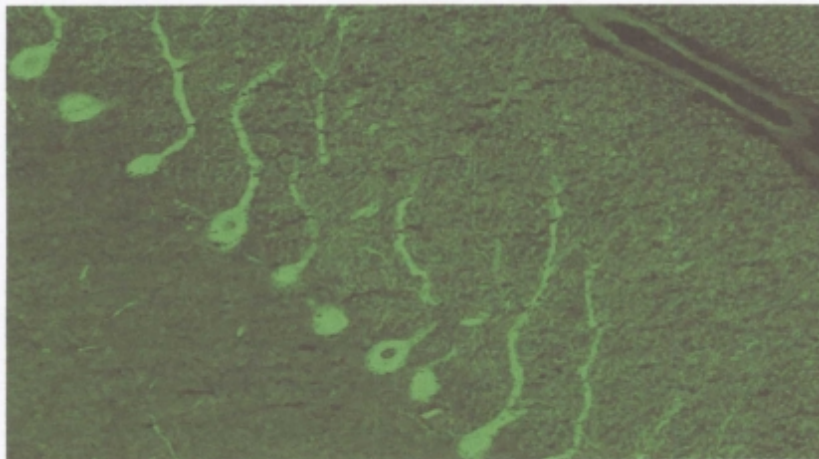


Figure 66 :

**Anticorps anti-PCA-2 (Purkinje cell antibody) . Immunofluorescence indirecte sur
coupe de cervelet de singe (195) .**

b.6° Anticorps anti-Tr.

Marquage cytoplasmique des cellules de Purkinje associé à une fluorescence punctiforme des dendrites de la couche moléculaire correspondant à la présence d'anticorps anti-Tr chez un patient atteint d'une ataxie cérébelleuse subaiguë au cours d'une maladie de Hodgkin.

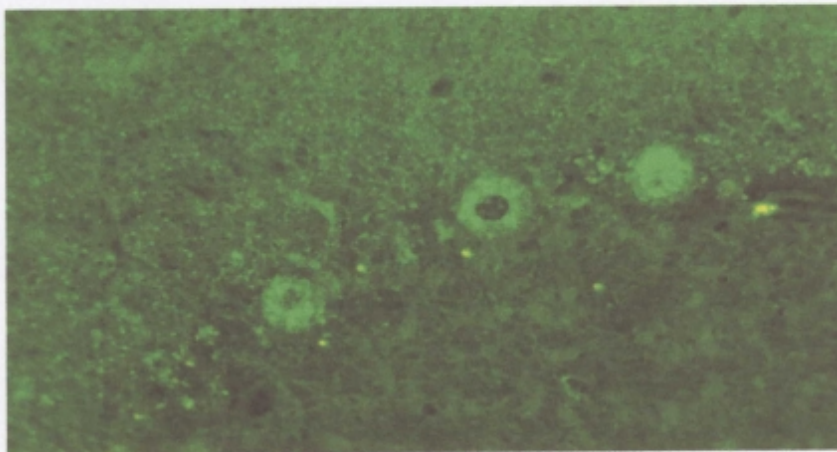


Figure67 : Anticorps anti-Tr. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195)

b.7° Anticorps anti-CV-2:

Marquage cytoplasmique des oligodendrocytes de la substance blanche correspondant à la présence d'anticorps anti-CV-2 confirmés par immunodot

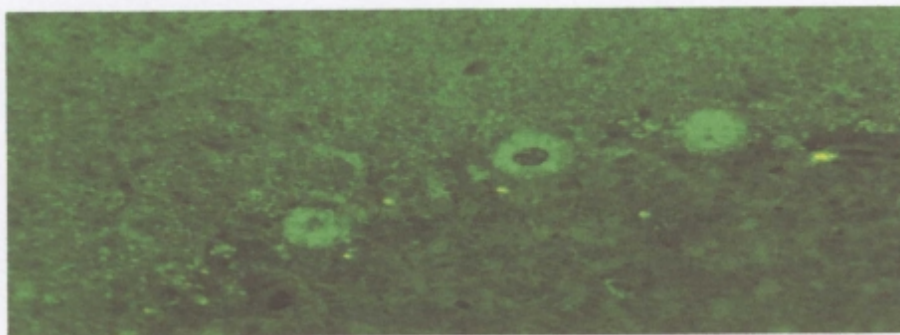


Figure 68 : Anticorps anti-CV-2. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195)

b.8° Anticorps anti-amphiphysine :

Marquage granulaire du cytoplasme des neurones de la couche granulaire associé à une fluorescence de la couche moléculaire du cervelet correspondant à la présence d'anticorps anti-amphiphysine identifiés par immunodot.

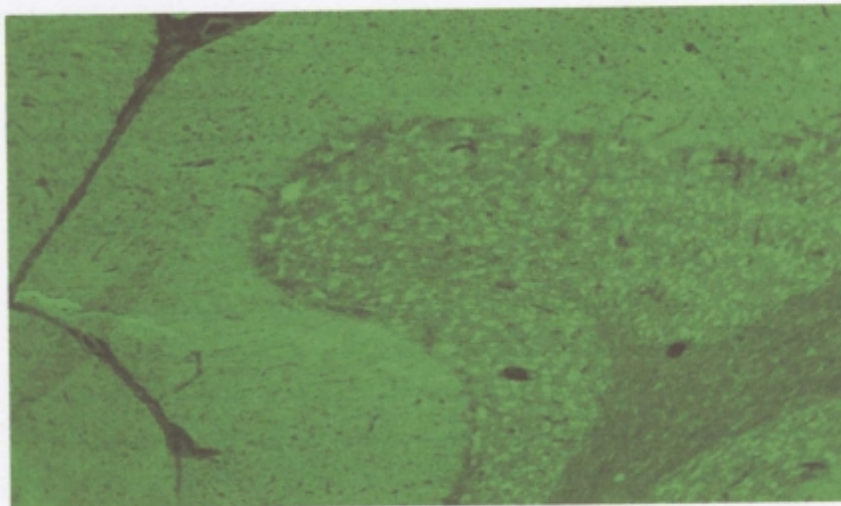


Figure 69 : Anticorps anti-amphiphysine. Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195).

b.9° Anticorps anti-GAD (glutamate décarboxylase) :

Les anticorps anti-GAD marquent de façon prédominante la périphérie du cytoplasme des neurones de la couche granulaire là où se situent les vésicules synaptiques. Ils sont identifiés par des techniques radio-immunologiques ou immuno-enzymatiques(195).

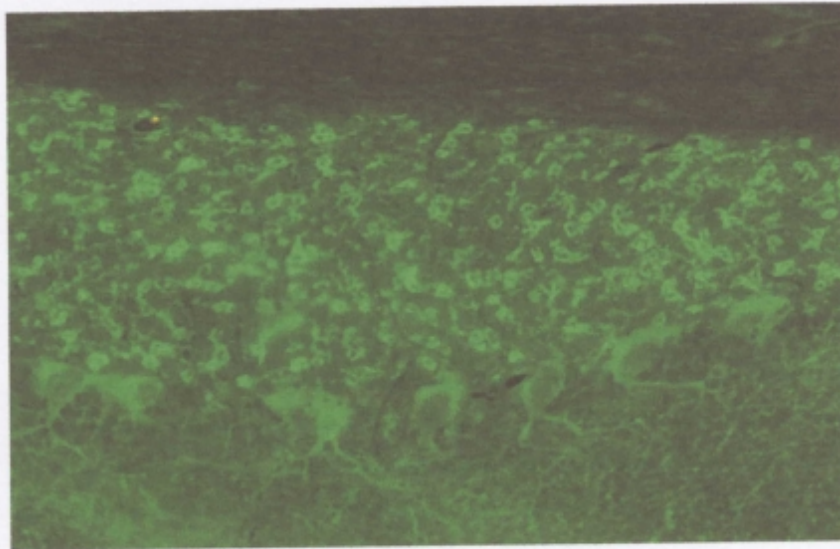


Figure 70 : Anticorps anti-GAD (glutamate décarboxylase). Immunofluorescence indirecte sur coupe de cervelet de singe(195)

C .Intérêt :

la localisation et l'aspect de la fluorescence au niveau des différents structures intracellulaire du cerveau et ou le cervelet orientent vers la ou les cibles des ACIC(195). Les anticorps anti-neuronaux sont très utiles pour le diagnostic des SNP (195)

L'indication principale d'une recherche d'anticorps anti-neurones est la présence d'un syndrome neurologique suspect d'être d'origine paranéoplasique (199). La spécificité diagnostique de l'immunofluorescence indirecte pour la détections des anti-onconeuronaux est supérieur à 97% et leur sensibilité se situé entre 30% et 40%(200)

La mise en évidence d'un anticorps anti-neuronal de spécificité définie chez un patient présentant un syndrome neurologique compatible avec une étiologie paranéoplasique est donc d'un grand intérêt pratique. Les auto-anticorps sont exceptionnels chez les patients sans signe neurologique et si c'est le cas, leur taux est alors très bas. La découverte d'un tel auto-anticorps permet d'affirmer la nature paranéoplasique de l'affection neurologique et d'orienter la recherche du cancer sous-jacent, les anticorps anti-Hu étant plus particulièrement liés aux carcinomes bronchiques à petites cellules, les anticorps anti-Yo aux

tumeurs gynécologiques, certains anticorps anti-cellules de Purkinje et la maladie de Hodgkin et les anticorps anti-Ri aux tumeurs du sein. (201)

d-Significations cliniques des ACIC :

les ACIC s'observent principalement chez des patients ayant un SNP , c'est-à-dire souffrant des troubles neurologiques associés à un cancer mais non causée par le cancer lui-même ou des métastases ,ni par des complication iatrogènes , infectieuses , vasculaires ,carencielles ou tumorales.reconnaissent des antigene présent dans les neurones et exprimés par certaines cellules tumorales,d'où le nom d'antigène onconeuroneux (195).

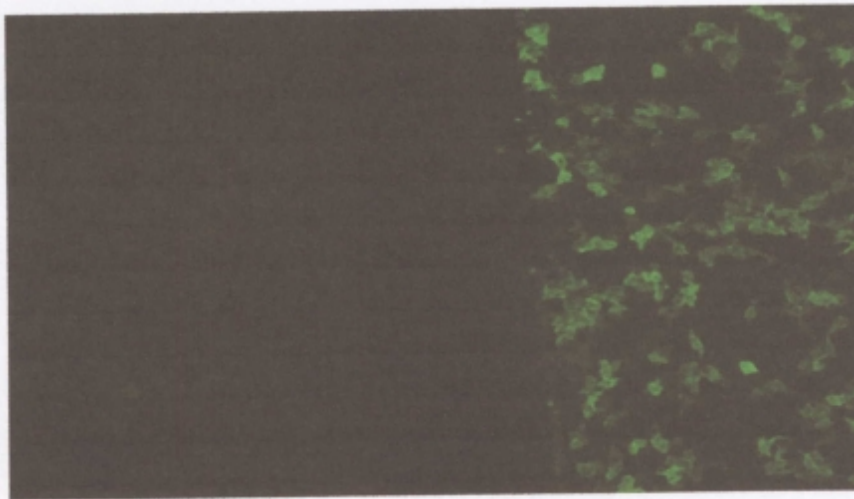
Tableau XII : Auto-anticorps à cible intracellulaire et leur signification clinique

Auto-anticorps	Signification clinique
anti-Hu / anti-Ri	Carcinomes à petite cellules du poumon (Hu80% et Ri)+carcinome se sein (Ri)
anti-Ma-2	78% associé au tumeur de testicule, ataxie cérébelleuse 40%
anti-Yo :	Carcinome de poumon et de sein 90%
anti-PCA-2	Tumeurs malignes du poumon
anti-Tr.	Maladies de Hodgkin80%
anti-CV-2	Dégénérescence cérébelleuse,encéphalite limbique, encéphalomyélite, Associe carcinome à petites cellules du poumon et de thymomes
anti-amphiphysine	Neuropathies sensorielle subaigue, neuropathie périphérique sensorimotrice, Carcinomes à petite cellules du poumon etcarcinome de sein (Ri)
anti-GAD	Syndrome raide de personne,tumeur de colon et de sein ,cancer de poumon et diabète

IV.2.6 .2.2/Anticorps anti-neuronaux à cible membranaire :

Les Ac anti-récepteurs NMDA, AMPA, GABAB et les Ac anti-LGI-1 et anti-CASPR-2 sont recherchés par immunofluorescence indirecte sur des préparations de cellules transfectées HEK-293 surexprimant l'Ag cible(195) .

a -Aspect :



**Figure 71: Anticorps anti-LGI-1 (*leucin rich glioma inactivated protein-1*) .
Immunofluorescence indirecte sur des préparations de cellules HEK-293**

(*human embryonic kidney-293*) transfectées ou non avec de l'acide désoxyribonucléique codant pour la protéineprotéine LGI-1. À gauche : les cellules HEK non transfectées ne sont pas reconnues par le sérum du patient ; à droite : le sérum du patient réagit avec les cellules HEK transfectées et surexprimant l'antigèneantigène *LGI-1* et contient donc des anticorps anti-LGI-1(195).

b. Intérêt :

À la lumière des données cliniques et des travaux expérimentaux, la plupart des ACM ont un rôle physiopathologique direct (202). Il existe un dysfonctionnement des cibles membranaires

synaptiques lié à la présence des Ac, et les maladies associées sont des maladies auto-immunes synaptiques ou synaptopathies auto-immunes ou encore, selon l'atteinte dans le SNC et/ou SNP, des encéphalopathies ou neuropathies auto-immunes synaptiques (203). Les neuropathies auto-immunes synaptiques associées aux ACM sont rares et peuvent être associées ou non à un cancer. Elles se manifestent principalement par des encéphalites, essentiellement limbiques, un syndrome myasthénique de Lambert-Eaton ou plus rarement par une neuromyotonie, une ataxie cérébelleuse ou un syndrome de l'homme raide (195)

Tableau XIII : Technique de recherche des auto-anticorps à cible membranaire .

Auto-anticorps	Technique de recherche
Ac anti-VGCC et anti-VGKC	techniques radio-immunologiques
Les Ac anti-récepteurs NMDA, AMPA, GABAB et les Ac anti-LGI-1 et anti-CASPR-2	IFI sur des préparations de cellules transfectées HEK-293 .

Conclusion :

Bien que les méthodes sérologiques soient diversifiés et améliorés (204). l'IFI reste à l'heure actuelle la technique globale de base qui détecte la plupart des auto-anticorps. L'aspect de la fluorescence donne des indices sur la ou les cibles moléculaires reconues par les auto-anticorps, il est ensuite possibles de compléter la recherche en faisant appel à d'autres méthodes (ELISA, tests radio-immunologiques,...etc) utilisant la ou les Ag purifiés ou recombinants que l'immunofluorescence a permet de le soupçonner (205).

La recherche d'auto-anticorps doit être confié à un laboratoire capable de mettre en œuvre l'ensemble des techniques nécessaires à leur détection et à leur identification.

Tout resultat doit être interpréter en fonction du contexte clinique d'où la nécessité d' une collaboration étroite entre le médecin prescripteur et le biologiste. Les biologistes doivent parfaitement connaitre les limites des techniques et des substrats utilisés et les cliniciens savoir que, dans une maladie auto-immune donnée, aucun anticorps n'est constant ni spécifique à 100 % (204).

Les techniques d'IFI manuelles sont consommatrices de temps et souffrent de variations intra et inter-laboratoires. Depuis de nombreuses années elles ont bénéficiés de l'apport des appareils préparateurs des lames réalisant la technique de façon automatisée et apportant ainsi un gain de temps et de précision par rapport au techniques manuelles. L'interprétation de la fluorescence necessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence et la lecture visuelle est aussi consommatrice de temps mais dépend essentiellement de la qualification d'opérateurs experts, condition indispensable à une bonne reproductibilité inter et intra-laboratoires. Les recherches, ces dernières années, s'appliquent à rendre l'IFI complètement automatisée de l'immunofluorescence avec l'apport de nouvelles générations d'automates : type luminex et des logiciels reconnaissant certains aspects de fluorescence ont été introduites et commencent à être utilisés, la plupart sont en cours de lévaluation et d'amélioration(206).

Glossaire :

- 1. Forces de Vander Waals :** forces électromagnétiques résiduelles faibles, d'origine quantique, s'exerçant entre des molécules et même des atomes neutres.
- 2. Cytokines :** sont des substances solubles de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du système immunitaire (les lymphocytes T) ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.
- 3. Kinétoplaste :** Ensemble particulier situé à la base du flagelle de protozoaires flagellés kinétoplastidés.
- 4. Le cytosquelette :** Le cytosquelette est un réseau filamenteux à l'intérieur d'une cellule, lui conférant ses propriétés mécaniques.
- 5. Vimentine :** Protéine fibreuse, constituant des filaments d'actine de la cellule animale
- 6. Fibroblastes :** cellules en forme de fusée, issues des cellules conjonctives . Ces cellules ont la caractéristique d'être en voie de prolifération, de multiplication.
- 7. Les microsomes :** sont des fragments de membranes du réticulum endoplasmique.
- 8. Un épithélium malpighien :** Un épithélium malpighien est un épithélium pavimenteux stratifié.
- 9. Un épithélium :** Tissu fondamental formant soit un revêtement externe (en surface de la peau) ou interne (en surface d'une muqueuse), soit une glande
- 10. Sérotypage :** Catégories dans lesquelles certains virus ou bactéries sont classés selon leur réaction en présence d'un sérum .
- 11. Corps De Negri :** c' est une inclusion cytoplasmique ou nucléaire éosinophile trouvée dans le cytoplasme des cellules neuronales infectées par le virus de la rage.
- 12. la toxoplasmose :** C'est une maladie parasitaire causée par le protozoaire *Toxoplasma gondii*.
- 13. Organes Lymphoïdes :** Un organe lymphoïde est un organe dans lequel les cellules du système immunitaire naissent, mûrissent ou agissent.
- 14. Les organes lymphoïdes centraux :** organes qui assurent la production des cellules du système immunitaire et l'acquisition de leur immunocompétence. Parmi eux, on distingue la moelle osseuse et le thymus.

- 15. Les organes lymphoïdes périphériques** : organes dans lesquels se rencontrent les diverses cellules du système immunitaire et où se déroulent les premières phases des réactions immunitaires acquises. Ex : La rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales, etc
- 16. la délétion clonale** : Retrait, par la mort de cellules (mort cellule), des lymphocytes immatures qui réagissent avec des antigènes pendant la phase de maturation.
- 17. L'apoptose** : correspond à un suicide cellulaire, ou mort cellulaire programmée
- 18. Le facteur rhumatoïde (FR)** : est une protéine anormale possédant une activité d'auto-anticorps.
- 19. Topoisomérase** : est une enzyme qui permet la division et la multiplication cellulaires en déroulant les doubles-brins d'ADN au niveau des noyaux cellulaires.
- 20. le kinétochore** : est un assemblage supramoléculaire de protéines au niveau des régions centromériques des chromosomes mitotiques.
- 21. Calcifications** : le processus normal ou anormal au cours duquel les tissus de l'organisme se durcissent, du fait d'un dépôt de sels de calcium.
- 22. Sclérodactylie** : sclérose des doigts et des orteils
- 23. Telangiectasies** : Dilatation de petits vaisseaux cutanés, formant de fines lignes rouges, parfois violettes.
- 24. la plaque équatoriale** : Désigne l'ensemble des chromosomes lorsqu'ils sont placés à l'équateur de la cellule lors de la métaphase.
- 25. Fuseau mitotique** : Il est constitué de microtubules et de protéines associées et forme un véritable fuseau entre les pôles opposés d'une cellule.
- 26. l'enolase** : une enzyme qui catalyse une étape dans la voie du métabolisme du glucose
- 27. Néoplasie** : c' est une tumeur ou une croissance anormale de nouveau tissu
- 28. Trypanosomes** : Organismes unicellulaires de petites tailles classés dans les kynétoplastidés, ainsi nommés parce qu'ils possèdent deux flagelles leur servant à nager.
- 29. Histone** : Protéines basiques s'associant à l'ADN pour former la structure de base de la chromatine.
- 30. Lysozomes** : petite structure sphérique (une vésicule) située dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.

31. Myéloperoxydase : enzyme dans les leucocytes (globules blancs) qui est liée à l'inflammation et les maladies cardiovasculaires.

32. Elastase : enzyme qui digère et dégrade un certain nombre de protéines, y compris l'élastine .

33. Cathepsine G : Tout de divers enzymes protéolytiques présentes dans les tissus des animaux qui catalysent l'hydrolyse des protéines en polypeptides.

34. le lysozyme : est une enzyme possédant la capacité de détruire la paroi cellulaire des bactéries après leur capture par les phagocytes et après stockage dans les lysosomes des phagocytes.

35. La lactoferrine : est une glycoprotéine de la famille des transferrines qui se lie au fer et a des effets bactériostatiques et bactéricides.

36. la céruléoplasmine : Il s'agit d'une protéine qui transporte : 90 % du cuivre dans le sang.

37. Un microscope confocal : C'est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est donc pas directement observé par l'utilisateur ; celui-ci voit une image recomposée par ordinateur.

38. Myalgies : désigne toutes les douleurs des muscles striés squelettiques.

39. Arthrites : c'est une maladie caractérisée par une inflammation et une augmentation de volume des articulations, qui deviennent douloureuses et rigides.

40. le parenchyme : Ensemble de cellules constituant le tissu fonctionnel d'un organe. Il s'agit d'un tissu qualifié de noble ou de fonctionnel et présentant les caractéristiques d'un organe.

41. Pepsinogène : Précurseur inactif de la pepsine, sécrétée par les cellules principales du fundus gastrique. (En milieu acide, le pepsinogène se transforme en pepsine.)

42. Mégaloblastique : relatif au mégaloblaste, érythroblaste pathologique de grande taille qui caractérise certaines anémies

43. Anticorps Hétérophiles : Anticorps obtenue chez une espèce différente de laquelle l'antigène est originaire.

44. Les cellules gliales : se situent dans le système nerveux. Elles entourent les neurones et participent au contrôle de l'environnement chimique et électrique

Les références bibliographiques

- (1) Baudry, C. Brezellec. H:immuno-microbio .cahiers du preparateur en pharmacie microbiologie immunologie collection porphyre 2ème édition de porphyre France,2006 ,page 94 .
- (2) Dominique Vuitton et al,immunologie ; page 179 ,181.
- (3) Jean-pierre revillard,immunologie 4ème édition chapitre 31 page 461 ,462 ,édition :de boek université,2001
- (4) RL. Humbel, Intérêt de la recherché des autoanticorps dans les maladies autoimmunes. Biologie et santé n° 1; 2000; page 66.
- (5) M. Idrissi Hatim, thèse n° 178/12 l'apport de l'immunofluorescence directe dans le diagnostic des dermatoses bulleuses année 2012 page 6
- (6) Coons AH.The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of flourscent antibody.J Immunol 1942 ; 45 : 159.
- (7) Humbel RL. Histoire des anticorps antinucléaires. GEAI l'info 1999 ; 2 : p. 1-2.
- (8) Friou GI.The early days of the antinuclear antibody story: where and how did it all start? Ann Med Interne (Paris) 1993 ; 144 : p. 154-56.
- (9) Beck JS.Variations in the morphological patterns of «autoimmune» nuclear fluorescence. Lancet 1961 ; 1 : 1203-5.
- (10) Humbel RL. Histoire des autoanticorps. GEAI 2000.Spectra Biologie 2000; p. 3-6.
- (11) Joëlle Goetz, Immunofluorescence indirecteGEAI l'info Numéro Spécial 2005 ; page 3.
- (12) RL Humbel ; autoanticorps et maladies autoimmunes; 2^{ème} édition 1997; page 44.
- (13) Michel A. et I ; Méthodes en immunologie . Edition 1990 ; page :122-139 .

(14): <http://www.mnhn.fr/mnhn/bpy/service-imagerie/fluorescence.pdf>

(15): harvey lodisk, aruold berk, paul mats udaira 2005, biologie moléculaire page:187.

(16) Ludovic De Gentile. Microscopie photonique en fluorescence. EMC - Biologie médicale 2003:1-0 [Article 90-60-0230].

(17) Spencer BROWN et Christel POUJOL, Mieux comprendre les fluorochromes pour la microscopie ; Page 4,5.

(18) Geoffrey M .cooper 1999 livre la cellule une approche moléculaire de boek université paris ,la France .

(19) Ludovic De Gentile. Microscopie photonique en fluorescence. EMC - Biologie médicale 2003:1-0 [Article 90-60-0230].

(20) bmd test de detection des anticorps anti-cytoplasme des polynucleaires neutrophiles (anca)fr,oct. 2009.

(21) Joëlle Goetz, et al. Immunofluorescence indirecte.GEAI ;Mai 2005.Page 4-5.

(22) Degenne D. Les bonnes pratiques de la recherche des anticorps antinucléaires par immunofluorescence sur cellules HEp-2.

(23) Renier G, Chevailler A. Quelques pièges du diagnostic biologique en immunologie. Rev Fr Lab 2005 ; 371 : p. 33-40.

(24) *Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2006, Issue 384, July–August 2006, Pages 21.* Pierre Youinou, Yves Renaudineau.

(25) *Le Revue de Médecine Interne, Volume 18, Issue 1, January 1997, Pages 72* J.L. Dupond, B de Wazières, H Gil, H Desmurs, F Jaeger, S Berthier, F Duchêne.

(26) Abul k et al *les bases de l'immunologie fondamentales et clinique page 156 édition françaises 2001.*

(27) Bernard weill,frédéric batteux ,immunopathologie et réactions inflammatoire ,de boek,2003,page 66 ,111 ,70

(28) <http://umvf.univ-nantes.fr/rhumatologie/enseignement/rhumato13/site/html/cours.pdf>

(29) Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in normal humans. I. Detection, isolation

and characterization. J Immunol 1982;128:2779–87.

(30) Gonzales R, Charlemagne J, Mahana W, Avrameas S. Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. Immunology 1988;63:31–6.

(31) Klinman D, Steinberg AD. Systemic autoimmune disease arises from polyclonal B–cell activation. J Exp M 1987;165:1755–60.

(32) Izui S, Zaldivar NM, Scher I, Lambert PH. Mechanism for induction of anti DNA antibodies by bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Anti-DNA induction by LPS without significant release of DNA in circulating blood. J Immunol 1977;119:2151.

(33) Autoanticorps, tolérance et auto-immunité Autoantibodies, tolerance and autoimmunity Pablo Opezzo, Guillaume Dighiero *Unité d'Immuno-Hématologie et d'Immunopathologie, Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France Reçu le 29 mars 2002 ; accepté le 12 avril 2002.

(34) Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2006, Issue 384, July–August 2006, Pages 33-41 Charlotte Magdelaine, Céline Vigneron, Danielle Degenne

(35) Anticorps antinucléaires Claire Goulvestre Laboratoire d'immunologie biologique, Groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent de Paul, AP-HP, Université Paris 5, Paris (75) Correspondance : Claire Goulvestre, Laboratoire d'immunologie biologique, Groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent de Paul, AP-HP, Université Paris 28 revue du Faubourg St Jacques, 75679 Paris Cedex 14.

(36) Fritzler MJ. Autoantibody testing. Procedures and significance in systemic rheumatic diseases. *Meth Archiv Exp Pathol*. 1986; 12: 224-60.

(37) Emlen W, O'Neill L. Clinical significance of antinuclear antibodies; comparison of detection with immunofluorescence and enzyme linked immunosorbent assays. *Arthritis Rheum*. 1997;40: 1612-8.

(38) Quand demander les auto-anticorps dans les maladies systémiques ? Comment les interpréter ?.....Hub

(39) Revue Médicale Suisse Revue Médicale Suisse N° 199 publiée le 15/04/2009 Utilité de la recherche des autoanticorps dans la pratique quotidienne Article de S. Petitpierre V. Aubert A. Leimgruber F. Spertini P.-A. Bart ScienceDirect

(40) apport de utilisation des cellules hep-2000@ pour la detection des anticorps antinucléaires : resultat d'une etude multicentrique Groupe d'etudea, Nils-Olivier Olsson b,*, Dominique Hellio-MorelC, Gkrald Ulrich", Michel Siramyd

(41) Aspect de la fluorescence cytoplasmique sur cellules HEP2 Gilles Renier ; Geline Beauvelain ; page 43.

(42) *Oncologie* (2003) 5: 311-326 Springer-Verlag 2003 Le cycle de division cellulaire et sa régulation L. Meijer Équipe Cycle Cellulaire, CNRS, Station Biologique, F-29680 Roscoff, France

(43) Savige J, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111: 507-13.

(44) Adams B.B, et al The diagnostic value of antinuclear anti body testing. *Int.j. Dermatol* . 39 (2000) 887. 891

(45) Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH, et al. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002;47(4):434-44.

(46) Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1601-11.

- (47) A.R.Bradwell , R.G.Hughes.Third Edition. 1997. Page 34-89.
- (48) Holingsworth P.N,et al Auto anti bodies;Elsevier,Amsterdam(1996)
- (49) Renier G,L autoimmunité au quotidien, Rev ,Fev,Lab 327 (2000) 75- 82.
- (50) A.R.Bradwell , R.G.Hughes.Third Edition. 1997. Page 106-117.
- (51) Musset L, les anticorps antinucléaires: methodes de detection et d'interpretation ,in: autoimmunité et autoanticorps Cahier de formation Bioforma,Paris 1999 pp, 39-72.
- (52) Plebani M, Pittoni M, Celadin M, Bernardi D, Mion MM. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2009;8:238—43.
- (53) Thèse de Sophie Connane 15/06 2001 propriétés du laboratoire d'immunologie CHRU de Lille. Page 38.
- (54) Revues générales et analyses prospectives ;Quel est l'intérêt de la recherche des anticorps anti-nucléaires dans la sclérodermie systémique ? P. Comacle, M. Padelli, Y. Renaudineau, P. Youinou* Laboratoire d'immunologie, hôpital Morvan, CHU de Brest, BP 824, 29609 Brest cedex, France Rec,u le 4 mai 2011 ; accepté le 2 juin 2011.
- (56) Fritzler M.J., Zhang M., Stinton L.M., Rattner J.B, Spectrum of centrosome autoantibodies in childhood varicella and post-varicella acute cerebellar ataxia, *BMC Pediatr.* 23 (2003) 11-18.
- (57) Mack GJ, Rees J., Sandblom O., Balczon R., Fritzler M.J., Rattner J.B., Auto -antibodies to a group of centrosomal proteins in human autoimmune sera reactive with the centrosome, *Arthritis Rheum.*41 (1998) 551-555.
- (58) Antrade L.E, Chan E.K., Peebles C.L., Tan E.M.,Two major autoantigen-antibody systems of the mitotic spindle apparatus, *Arthritis. Rheum.* 39 (1996) 1643-1653.
- (60) Rattner J.B., Rees J., Arnett EC., Reveille J.D., Gotdstein R., Fritzler M.J., The centromere kinesin-like protein, CENP-E, An autoantigen in systemic sclerosis, *Arthritis Rheum.* 39 (1996) 1355-1361.

- (61) Rattner J.B., Rees J., Whitehead C.M., Csiano C.A., Tan E.M., Humbel R.L., Conrad K., Fritzler MJ., High frequency of neoplasia in patients with autoantibodies to centromere protein CENP-F, *OlIn. Invest. Med.* 20 (1997) 308-319.
- (62) Shur PH, De Angelis D, Jackson JM. Immunological detection of nucleic acids and antibodies to nucleic acids by counterimmunoelectrophoresis. *Clin Exp Immunol.* 1974; 17: 209-15.
- (63) Bridges AJ, Lorden TE, Havighurst TC. Autoantibody testing for connective tissue diseases. Comparison of immunodiffusion, immunoblot, and enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol.* 1997; 108: 406 -10.
- (64) RL .Humbel.Actualité sur les auto-anticorps (GEAI) 7^{ème} édition 2012 .
- (65) *Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2006, Issue 384, July–August 2006, Pages 43-50* Gilles Renier, Céline Beauvillain
- (66) Revue de Groupe d'Etude des maladies Autoimmunes : Actualité sur les auto anticorps 2012 l'identification des AAN page 36.
- (67) Olsson N.O., Les anticorps anti-ADN, in: Autoanticorps, marqueurs des maladies autoimmunes. Paris (1999) pp. 93-102
- (68) Alain Chevailler a,* , Celine Beauvillain a, Anne Mcilroy a ; dépistage des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires anti-nuclidosome, anti-ADN natif et anti-histones insolubles page 53.
- (69) Chrétien P, Dauvin M, Hélin P, et al. Comparaison de l'immunofluorescence indirecte sur *Crithidia luciliae*, du test de Farr, et des méthodes immunoenzymatiques pour le dépistage des autoanticorps anti-ADN natif. *Ann Biol Clin* 1994; 52:645-50.
- (70) Preud'homme JL, Rochard E, Gouet D, Danon F, Alcalay M, Touchard G *et al.* Isotypic distribution of anti-double-stranded DNA antibodies: a diagnostic evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay. *Diag Clin Immunol.* 1988; 5: 256-61.
- (71) RL. Humbel. Autoanticorps et maladies autoimmunes. 2^{ème} édition 1997 page 83.

(72) Johanet C ,Ballot E ,auto-anticorps en hépatologie EMC (elsivier Masson SAS 6 PARIS)hépatologie ,7-007-B-30 -2001 ,page 1 ,2

(73) Vassilopoulos D, et al. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with various pulmonary diseases or multiorgan dysfunction. *Arthritis Rheum* 2003;49:151–5.

(74) Van der Woude FJ, et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomaosis. *Lancet* 1985;1:425–9.

(75) Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic. *N Engl J Med* 1988;318:1651–7.

(76) R. Sghiri, H, et al, *Pathologie Biologie, Volume 57, Issue 5, July 2009, Page 399*

(77) Gug gorochov Thomas papo edition:doin,2000.page 370

(78) Y. Renaudineau, D. Beauvillard, et al, *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 26, Issue 1, February 2011, Pages 28-29*

(79) Von Vietinghoff S, Tunnemann G, et al. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood*2007;109:4487—93.

(80) Savige J, Gillis D, Benson E, Davies D, Esnault V, Falk RJ, et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies(ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999;111: 507–13.

(81) Vassilopoulos D, Niles J-L, et al. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with various pulmonary diseases or multiorgan dysfunction. *Arthritis Rheum* 2003;49:151–5.

(82) Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS* 1989; 6:12-3.

(83) Savige J, Dimech W, Fritzler M, et al. International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Pathol* 2003;120:312—8.

(84) Wik A, delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of anca, *acta pathol.microbiol,immunol,scand* 97.T(suppl,8)(1989)12-13

(85) *Revue Française des Laboratoires, Volume 2002, Issue 341, Supplement, March 2002, Pages 24-Françoise Oksman.*

(86) Chevailler A, Noel LH, Renier G, Gardembas-Pain M, Subra JF, Nusbaum P, et al. Determination of antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) specificity by immunofluorescence on chronic myelocytic leukemia cells. *J Immunol Methods* 1992;147:101-9.

(87) *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 26, Issue 1, February 2011, Pages 29*
Y. Renaudineau, D. Beauvillard, I. Ségalen, C. Leroyer, Y. Le Meur, P. Youinou

(89) Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity* 2005;38:93-103.

(90) Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, et al. Diagnostic value of standardized assays for antineutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int* 1998;53:743—53.

(91) *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 4, Issue 5, November 1989, Pages 7-15*
J.C. Homberg

(92) Y. Renaudineau, D. Beauvillard, I. Ségalen, et al, *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 26, Issue 1, February 2011, Pages 29*

(93) Noel LH Les auto-anticorps, anti cytoplasme des polynucléaires (ANCA) : description et rôle immunopathologique *Ann Intern Med* 1999 ; 131 (3) : 178-183.

(94) Segelmark M, Baslund B, Wieslander J, et al. Some patients with antimyeloperoxidase antibodies have an ANCA pattern. *Clin Exp Immunol* 1994 ; 96 : 458-465.

(95) *Revue Française des Laboratoires*, Volume 2002, Issue 341, Supplement, March 2002, Pages 24- Françoise Oksman

(96) Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Autoimmunity* 2005 ; 38 : 93-103.

(97) Coppel RL, McNeilage LJ, Surch CD, Van de Water J, Spithill TW, Whittingham S, et al. Primary structure of the human M2 mitochondrial autoantigen of primary biliary cirrhosis: dihydrolipoamide acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 7317-7321

(98) Moteki S, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology* 1996 ; 23 : 436-444

(99) Moteki S, Leung PS, Dickson ER, Van Thiel DH, Galperin C, Buch T, et al. Epitope mapping and reactivity of autoantibodies to the E2 component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis using recombinant 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Hepatology* 1996 ; 23 : 436-444

(100) Manns M, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF. The major target antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450 db I. *J Clin Invest* 1989 ; 83 : 1066-72.

(101) Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988 ; 8 : 1662-1666

- (102) Lenzi M., Manotti P., Muratori L., Cataleta M., Ballardini G., Cassani F., et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection *Gut* 1995 ; 36 : 749-754
- (103) Vitozzi S., Lapierre P., Djilali-Saiah I., Alvarez F. Auto-antibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein *J. Immunol. Methods* 2002 ; 262 : 103-110
- (104) Johanet C., Ballot E. Hépatites auto-immunes : pertinence des anticorps anti-SLA et des anticorps anti-LC1 *Spectra Biol* 2005 ; 145 : 30-34
- (105) Lapierre P., Hajoui O., Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis *Gastroenterology* 1999 ; 116 : 643-649
- (106) Obermayer-Straub P., Strassburg C.P., Manns M.P. Autoimmune hepatitis *J.Hepatol.* 2000 ; 32 : 181-197
- (107) Alvarez F., Berg P.A., Bianchi F.B., Bianchi L., Burroughs A.K., Cancado E.L., et al. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis *J. Hepatol.* 1999 ; 31 : 929-938
- (108) Chretien-Leprince P., Ballot E., Andre C., Olsson N.O., Fabien N., Escande A., et al. Diagnostic value of anti-F-actin antibodies in a french multicenter study *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005 ; 1050 : 266-273
- (109) Zachou K., Rigopoulou E., Dalekos G.N. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease *J. Autoimmune Dis.* 2004 ; 1 : 2

- (110) Tartakovsky F., Worman H.J. Detection of Gp210 autoantibodies in primary biliary cirrhosis using a recombinant protein containing the predominant autoepitope *Hepatology* 1995 ; 21 : 495-500
- (111) Bandin O., Courvalin J.C., Poupon R., Dubel L., Homberg J.C., Johanet C. Specificity and sensitivity of gp210 autoantibodies detected using an enzyme-linked immunosorbent assay and a synthetic polypeptide in the diagnosis of primary biliary cirrhosis *Hepatology* 1996 ; 23 : 1020-1024
- (112) M. Padelli a, P. Comaclea, J.-B. Noursbaumb, P. Youinoua, Y. Renaudineaua Immuno-analyse et biologie spécialisée (2011) 26, page 252
- (113) RL, Humbel 2^{ème} édition ,Elsevier, auto-anticorps et maladies auto-immuns pages 130
- (114) Catherine Johanet, Eric Ballot. Autoanticorps et maladies auto-immunes du foie. EMC - Biologie médicale 2002:1-0 [Article 90-30-0110
- (115) RL, Humbel revue GEAI numeros 5 2005 , page 2 ,3, 4 .
- (116) RL, Humbel , Intérêt des la recherche des auto-anticorps au caurs des maadies auto-immunes. 2000 ; page 71.
- (117) REFéCatherine Johanet, Eric Ballot. Autoanticorps et maladies auto-immunes du foie. EMC - Biologie médicale 2002:1-0 [Article 90-30-0110].
- (118) Eyquem,A , j. Saint . Martin J. De -- feuil. Biol., 1970, 11, 55-65.
- (119) Christiane Chéreau. Autoanticorps dans l'anémie de Biermer. EMC - Biologie médicale 2002:1-0 [Article 90-30-0095].
- (120) A.R Bradwell et al,advanced atlas of autoantibody patterns ,ISBN.page30
- (121) R.G.Huges et al. Atlas of tissue auto-antibodies Third Edition page 61.

- (122) Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, Volume 14, Issue 5, November–December 1974, Pages 249-257 C. Trepo, D. Andre
- (123) M. Padelli a, P. Comaclea, J.-B. Nousbaumb, P. Youinoua, Y. Renaudineaua2011 Elsevier Masson SAS. Immuno-analyse et biologie spécialisée (2011) 26, 250—255
- (124) Czaja AJ, Nishioka M, Morshed SA, Hacia T. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis. Gastroenterology 1994;107:200-7.
- (126) Padelli a, P. Comaclea, J.-B. Nousbaumb, P. Youinoua, Y. Renaudineaua2011 Elsevier Masson SAS. Immuno-analyse et biologie spécialisée (2011) 26, 250-255
- (127) Johanet C., Dubel L, Chazouill~'as 0., Auto-anticorps en h6patologie, Pathol. Biol. 47 (1999) 997- 1005.
- (128) Johanet C., Ballot E., H~patitas auto-immunes: pedinance des anticorps anti-SLA et des anticorpa anti-LC1, Spectra Biol. 145 (2005) 30-34.
- (129) Grego G.V.et al , A 12 year-old gid with antimitochondrial antibody-positive autoimmune hepatitis, J. Hepatol 27 (1997) 751-'/54.
- (130) Dubel L.,et al Johanet C., Kinetics of anti-M2 antibodies after liver transplantation for primary biliary cirrhosis, J. Hepatol. 23 (1995) 674-680.
- (131) Chretien-Leprince P., et al., Diagnostic valueof anti-F-actin antibodies in a fremmh multicenter study, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1050 (2005) 266-273.
- (132) Kagnoff MF, Paterson YJ, Kumar PJ, Kasarda DD, Carbone R, Unsworth DJ, Austin RK. Evidence for the role of human intestinal adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. Gut 1987 ; 28 : 995-1001.

- (133) Michel A ,et al, Méthodes en immunologie ; 1990. Page 141.
- (134) Humbel RL Auto-anticorps et maladies auto-immunes. Paris: Collection Option Bio/Elsevier1997
- (135) *Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2008, Issue 404, Part 1, August 2008, Pages 31-36* Françoise Bienvenu
- (136) Georgia Malamut, Christophe Cellier ;*Gastroentérologie Clinique et Biologique, Volume 28, Issue 10, Part 1, October 2004, Pages 863.*
- (137) Pascale Chrétien-Leprince : Autoanticorps de la maladie coeliaque ; France .
- (138) RL Humbel, autoanticorps et maladies autoimmunes, 2^{ème} édition 1997 page 144
- (139) Philippe de Saussure, Francisca Joly, Yoram Bouhni : *Revue du Rhumatisme, Volume 72, Issue 7, July 2005, Pages 593-596.*
- (140) R.L.HUMBEL. Autoanticorps et autoantigènes de la peau.2003 page 14
- (141) Eyquem,A , j. Saint . Martin J. De -- feuil. Biol., 1970, 11, 55-65.
- (142) RL, Humbel revue GEAI numeros 5 2005 , page 2 ,3, 4 .
- (144) Christiane Chéreau. Autoanticorps dans l'anémie de Biermer. EMC - Biologie médicale 2002:1-0 [Article 90-30-0095].
- (145) Villalta D., et al , Testing for IgG class antibodies in celiac disease patients with selective IgA deficiency. A comparison of the diagnostic accuracy of 9 IgG anti-tissue transglutaminase, 1 IgG anti-gliadin and 1 IgG anti-deaminated gliadin peptide antibody assays, Clin. Chim. Acta 382 (2007) 95-99.
- (146) Françoise l'actualité de l'immunologie diagnostic en 8008 page 34.
- (147) Humbel RL Auto-anticorps et maladies auto-immunes. Paris: Collection Option Bio/Elsevier1997

(148) Ghedira I ;Anticorps anti-endomysium, anti-réticuline et anti-gliadine, intérêt dans le diagnostic de la maladie coeliaque chez l'enfant

(149) R.G.Hughes et al ; Atlas of Tissues Autoantibodies ;Third Edition 1997, page 72.

(150) Pascale Chrétien-Leprince : Autoanticorps de la maladie coeliaque ; France

(151) Revue du Rhumatisme 72 (2005) 593–596, Les autoanticorps dans la maladie coeliaque de l'adulte : quelle aide au diagnostic ? ELSEVIER .

(152) RL, Humbel 2ème édition ,Elsevier, auto-anticorps et maladies auto-immuns pages 130 ,

(153) Levy JB, Turner AN, Rees AJ, Pusey CD. Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression. Ann Intern Med 2001;134:1033–42.

(154) Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 26, Issue 2, April 2011, Pages 60-67
D. Beauvillard, I. Ségalen, Y. Le Meur, C. Leroyer, Y. Renaudineau, P. Youinou

(155) R.G.Hughes, et al,Atlas of Tissue Autoantibodies.Third Edition page 90.

(156) Boitard C ,Timsit J(1990) Diabete et auto-immunité .Ann Endocrinol 51 ,119-122

(157) F Rharbaoui,et al : Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Vole 10, Issue 5, 1995, Pages264.

(158) RL Humbel : Autoanticorps et maladies autoimmunes 2ème édition 1997. Page 189-190.

(159) Bottazzo GF, et al : (1991) novel considerations on the antibody /autoantigen system in type1 (insulin dependent) diabetes mellitus .Ann Med 23,453-461.

- (160) Bottazzo GF, et al (1974): islet cell antibodies in diabetes mellitus with polyendocrine deficiency. Lancet II, 1279-1283.
- (161) R.L. Humbel : Maladies auto-immunes des glandes endocrines GEAI info n°5 Octobre 2002 pages 7, 11, 12, 13.
- (162) Petraki M, Immunofluorescence Patterns in Autoimmunity. 3rd EDITION. Page 46.
- (163) RL Humbel ; G Gilson : les marqueurs immunologiques du DID 1999 ELSEVIER.
- (164) RL Humbel : Maladies autoimmunes des glandes endocrines 2002 Page 7-8.
- (165) R.G.Hughes. M.J.Surmacz. et al ; Atlas of tissue antibodies. 1997; Page 109.
- (166) RL Humbel : Autoanticorps et maladies autoimmunes 2^{ème} édition 1997. Page 46.
- (167) Doniach D, et al. Auto-antibodies in Hashimoto's disease. Lancet 1956 ; ii : 820-1.
- (168) Peoc'h K, et al. Polyspecificity of antimicrosomal thyroid antibodies in hepatitis C virus-related infection. Am J Gastroenterol 2001 ; 96 : 2978-83.
- (169) N. FABIEN, J.-C. MONIER, Les autoanticorps anticorticosurrénale dans la maladie d'Addison auto-immune. 2002.
- (170) BLIZZARD RM, KYLE M. Studies of the adrenal antigens and antibodies in Addison's disease. J Clin Invest 1963 ; 42 : 1653-60
- (171) RL Humbel. Autoanticorps et autoantigènes de la peau. 2003 ; page 5.
- (172) RL Humbel. Autoanticorps et autoantigènes de la peau. 2003 ; page 12 -15.
- (173) R.G.Hughes; et al: Atlas tissue autoantibodies. 1997; page 113.
- (174) Anderson JR, et al. Autoantibodies in Addison's disease. Lancet 1957 ; i : 1123-4.

(175) Furmaniak J, et al; Immunoprecipitation of human adrenal microsomal antigen. FEBS Lett 1988 ; 231. 25-28.

(176) Winqvist O, et al. 21-Hydroxylase, a major autoantigen in idiopathic Addison's diseases.

(177) R.G.Hughes; et al: Atlas tissue autoantibodies. 1997; page 98- 99.

(178) COLL J, et al :Immunoprecipitation assay for antibodies to 21-hydroxylase in autoimmune adrenal diseases. Clin Chem 1995 ; 41 : 375-80.

(179) Tanaka H, et al. Steroid 21-hydroxylase autoantibodies: measurements with a new immunoprecipitation assay. J Clin Endocrinol Metab 1997 ; 82 : 1440-6.

(180) Peterson P, et al: Immunoprecipitation of steroidogenic enzyme autoantigens with autoimmune polyglandular syndrome type I (APS I) sera; further evidence for independent humoral immunity to P450c17 and P450c21. Clin Exp Immunol 1997 ; 107 : 335-340.

(181) Uibo R , ,et al autoantibodies to cytochrome P450 Scc, P450 c17, and P450 c21 in autoimmune polyglandular disease types I and II and in isolated Addison's disease J Clin Endocrinol metab 1994;78:323-8.

(182) Neufeld M, et al Autoimmune polyglandular syndromes. Pediatr Ann 1980, 9 : 154-162.

(183) Volpe R. 1985. Autoimmunity in endocrine disease. New-York: Marcel Dekker, p. 473.

(184) Volpe R. Autoimmune endocrinopathies: aspects of pathogenesis and the role of immune assays in investigation and management. Clin Chem 1994, 40/11 (B), 2132-2145.

(185) Blizzard RM, Chee D, Davis W. The incidence of parathyroid and other antibodies in the sera of patients with idiopathic hypoparathyroidism. Clin Exp Immunol 1996, 1 : 119-128.

(186) RL Humbel. Les auto-anticorps et maladies auto-immunes. 2ème édition .Page 205.

(187) N. Fabien, J.-C. Monier. Les autoanticorps anti-parathyroïde. Octobre 2002.

(188) MC Elduff A, et al. Anti-idiotypic PTH antibodies as a cause of elevated immunoreactive parathyroid hormone in idiopathic hypoparathyroidism a second case : another manifestation of autoimmune endocrine disease? *Calcif Tissue Int* 1992 ; 51 : 121-126.

(189) BHOL K, et al ; Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 5239-43.

(190) SPÄTH S, et al ; IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of desmoglein 3 in active pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 2001 ; 144 : 1183-8.

(191)Tremeau MC. Et al ; Immunoglobulin G subclass distribution of anti-cellular substance antibodies in pemphigus *Ann dermatolol veneriol /* 1995;122:409-11.

(192) GOLDBLATT F, GORDON TP. Antibodies to blood group antigens mimic pemphigus staining patterns : a useful reminder. *Autoimmunity* 2002 ; 35 : 93-6.

(193) RL, Humbel 2 éme édition ,Elsevier, auto-anticorps et maladies auto-immuns pages 219.

(194) Graus F., Saiz A., Dalmau J. Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS *J Neurol* 2010 ; 257 : 509-517

(195) J. Goetz, N.O. Olsson, R.L. Humbel. Anticorps antineuronaux. EMC - Biologie médicale 2013;8(1):1-8 [Article 90-30-0008-A].

(196) Humbel RL. Ac antionconeuronaux et syndromes neurologiques paranéoplasiques. GEAI l'info no 7, 2005, www.geai-lesautoanticorps.fr.

(197) Humbel RL. État actuel des Ac anti-canaux potassiques (anti-VGKC). Mise au point. 2011

(198) Humbel RL. Anticorps antionconeuronaux et syndrome neurologiques paranéoplasiques. MAI 2005

(199) Raspotnig M. et al. Onconeural antibodies in patients with neurological symptoms: detection and clinical significance *Acta Neurol Scand Suppl* 2011 ; 191 : 83-88

(200) Tampoia M., et al. Diagnostic accuracy of different immunological methods for the detection of antineuronal antibodies in paraneoplastic neurological syndromes *Immunol Invest* 2010 ; 39 : 186-195

(201) J Honnorat, JC Antoine 2 Rev Mdd Interne (1993) 15, 124-133

© Elsevier, Paris

(202) Gilhus N.E. Lambert-Eaton myasthenic syndrome: pathogenesis, diagnosis, and therapy *Autoimmune Dis* 2011 ; 2011 : 973808

(203) Dalmau J. et al. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis *Lancet Neurol* 2011 ; 10 : 63-74

Annexes

Annexe I :

Le système amplificateur 'Biotine-streptavidine' :

Le système biotine-streptavidine (ou biotine-avidine) repose sur la haute affinité entre la biotine, vitamine de faible masse moléculaire, soluble dans l'eau que l'on peut facilement conjuguer à une grande variété de molécules biologiques, et l'avidine (ou streptavidine), la liaison étant plus forte que l'interaction antigène-anticorps. Quatre molécules de biotine peuvent se lier à l'avidine, qui peut elle-même être marquée intensément par un fluorochrome (plusieurs molécules de fluorochrome peuvent se fixer sur une molécule d'avidine). C'est une méthode de détection immunocytochimique très sensible en particulier avec des anticorps biotinilés.

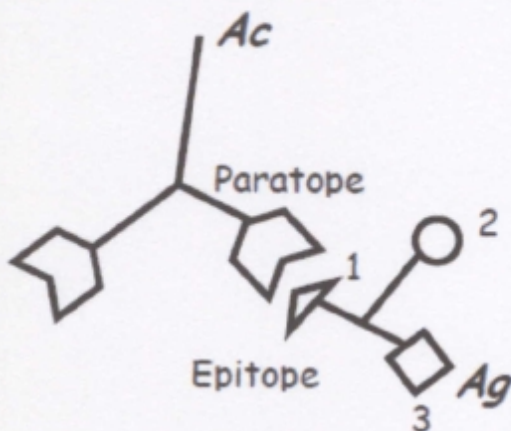
La très grande amplification du signal qui peut être obtenue permet de la détection d'antigène peu abondant et l'emploi de dilutions élevées du premier anticorps. Il est possible de réaliser **des doubles marquages** en utilisant deux fluorochromes différents. La taille des seconds anticorps biotinilés étant pratiquement identique à celle des seconds anticorps natifs, la capacité de pénétration n'est pas gênée. L'avidine peut être marquée par la fluorescéine, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), l'isothiocyanate de rhodamine (RITC) ou l'isothiocyanate de téramethylrhodamine (TRITC).

Annexe II :

La réaction 'antigène-anticorps' :

La réaction antigène anticorps est due à l'interaction entre les épitopes de l'antigène et les paratopes de l'anticorps . (4) cette interaction est un phénomène spécifique ,les molécules ,après rencontre ,établissent des liaisons non covalentes et non spécifiques ,la spécificité est donc le seul fait de l'étroite complémentarité de structure des sites réactifs de l'antigène et de l'anticorps. Les meilleurs anticorps sont ceux qui ont la plus grande complémentarité avec l'antigène .

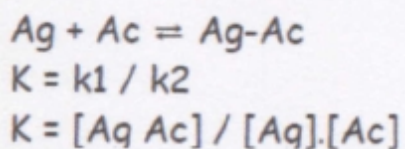
Un anticorps peut néanmoins établir des liaisons avec deux épitopes dissemblables mais ayant cependant des parentés de structure .(5)



La réaction antigène- anticorps se manifeste par(5) :

- Une précipitation ,dans le cas d'un antigène soluble .
- Une agglutination ,si l'Ag est particulaire.
- Une lyse ,pour certaines cellules ,hématies ou bacterie en présence de complément .

La formation d'un complexe Ag -Ac peut être assimilée à un équilibre chimique :



La constante d'équilibre k represente la constante d'affinité de l'anticorps pour l'Ag ,cette constante peut être déterminé par

- une dialyse à l'équilibre : la différence de niveau à l'équilibre correspond à la quantité d'haptène liée à l'anticorps
- la représentation de scatchard dans le cas d'un haptène :
A partir des données expérimentales on fait la représentation de Scatchard qui donne l'affinité de l'anticorps ainsi que sa valence (nombre de paratopes par molécule)
- ✓ lorsque la moitié des sites d'anticorps sont liés à l'haptène : $K = \text{affinité} = 1/[Ag]$.
- ✓ + la valeur de K est grande, plus l'anticorps est affin et plus il détecte de faibles concentrations d'haptène. .
- ✓ La constante d'équilibre k dépend pour un couple Ag –Ac :
- Du pH (qui modifie l'état ionique des groupements dissociables de ag et de l' Ac).
- De la temperature.
- De la force ionique du milieu.

Les liaisons qui assurent l'association entre Ag et l'Ac sont des liaisons secondaires, faibles (ce qui explique la réversibilité de la réaction) ce sont des liaisons :

- Ioniques : ion-ion , entre 2 groupements ioniques 2 à 5 k cal / mol
- Hydrogène : dipôle –ion ou dipôle –dipôle. entre atomes électropositifs et électronégatif faibles
- De van- der-waals : entre dipôles non permanents, les plus faible, dues au mouvement des électrons dans la molécule
- Hydrophobes : entre groupements polaires ou hydrophobes faibles

Il y a donc des forces d'attraction et de répulsion entre le paratope et l'épitope. L'énergie de liaison est élevée entre le paratope et l'épitope car toutes ces liaisons sont de faible énergie mais sont très nombreuses. l'énergie dépend de la complémentarité entre les 2 sites et quand on mesure l'affinité d'un anticorps pour son antigène, on mesure la somme des forces attractives et répulsives

Notion anticorps monoclonaux et anticorps polyclonaux :

-Les anticorps monoclonaux :

Ils sont parfaitement homogènes mais ne reconnaissent qu'un seul épitope .

-les anticorps polyclonaux :

Ils sont contenus dans des antiserums ,qui permettant des liaisons de tres haut avidités avec lesAgs.

Annexe III :

Tableau I : Produits *antifading* utilisés en immunofluorescence.

Produit	Concentration dans 100 ml de liquide de montage
Dabco 1,4diazobicyclo (2,2,2)octane	2,5 g + 1g d'azide de sodum à pH 7,4.
PPD p-phénylènediamine	0,2 g à pH 7,5
NPG N-propyl-gallate	2,0 g à pH 7,0

Annexe IV :

1)Préparation des coupes d'organes :

1. 1)matériel :

- Nécessaire à la dissection :
 - Planche à dissection
 - Bistouri
 - Paire de ciseaux fins
 - Pince sans griffe
 - Matériel congélant :
 - Azote liquide (-196 C °)
 - Mélange neige carbonique –acétone (-70C°)
 - Cryostat :type MILES –AMES
 - Ventilateur
 - Lames porte objet :de 1mm d'épaisseur et parfaitement dégraissés et lamelle correspondant
 - Marqueurs à pointes de diamant
 - Bacs à coloration
1. 1 :coupes d'organe de rat :
1. 1.1)obtention de fragments de rat :

- Prendre un rat male agé de 2 à 3 mois
- Sur l'animal anesthésié à l'éther, prélever les 3 organes suivant : foie ,rein,estomac.découper chacun d'eux en petits cubes d'environ 1 cm de coté .pour le rein ,la surface superieur de la coupe doit présenter les défferente structure sde la corticale et de la médullaiere .quant à l'estomac,il est découpé sur une bande de 1cm de coté au niveau de l'épithilium glandulaire ,partie rosé de l'organe correspondant à la moitié inférieur de l'organe .cette bande est enroulée sur elle sur elle –même .
- Disposer ensuite les trois organes sur une feuille d'aluminium recouvrant un portoir du cryostat .(on s'arragera pour que tous les fragments d'organe aient à peu près la même hauteur et que leurs faces superieurs présents toutes les différents structures de l'organe correspondant)
- Plonger le portoire dans le bain congelant par l'intermédiaire d'un fil recourbé ,et l'y maintenir tant que le bouillonnement persiste (environ 15 S)les boccs peuvent ensuite etre consrvé plusieurs mois à -80 °C mais à peine 72 H à -20°C

1.1.2) Confection des coupes :

- Placer le bloc sur le bord du portoire (un peu d'eau versée autour de ce bloc permet ,après solidification ,de fixer le bloc au portoir)
- Apre avoire placer le portoir en position de coupe ,enlever ,à l'aide du rasoir ,la partie superieure en coupes épaisses jusqu'à ce que l'on observe toutes les structures tissulaires intéressantes .
- Effectuer alors des coupes de 4mm d'épaisseur .la coupe qui trouve sur le rasoir est recueillie sur une lame porte –objet par opposition franche .(on peut aider à la fixation en chauffant la lame sur le coté opposé et au niveau de la coupe à l'aide de l'index)
- Sécher les coupes grace à un ventilateur durant 30 mn environ .

2) culture de cellules Hep 2 :

2 .1) Matériel et réactifs :

- Ho
- tte a flux laminaire : équipée d'un bec de bunsen
- container a azote liquide
- bain -marie à +37°C
- Flacons pour cultures cellulaires stériles de 25 cm carrés
- Etuve à CO2 réglée à 37°C
- Pipettes stériles
- Lames dynatech : à 8,10,12,ou 18 alvéoles ,dégraissées et stérilisées
- Ampoules stériles : pour la congélation
- Boites de pétri carrés stériles
- Milieu DMEM complémenté pour cultures cellulaires :

- * Milieu DULBECCO (DMEM).....13,4g
- * NaHCO33,3g
- * Solution de Peni-Strepto(5000-5mg / ml) 5 ml
- * Eau bidistillée..... QSP..... 1000 ml

Ajuster le pH à 7,2 et faire une pré -filtration sur filtre millipore 0,45 µ, puis une filtration stérilisante sur filtre 0,22µ. Répartir stérilement en flacons de 100 ml .

Rajouter dans un flacon de 100 ml ,avant emploi :

- * Sérum de veau foetal (SVF).....5 ml
- * Sérum de péni-strepto.....1ml

- Solution de trypsine -verséne :

- * Trypsine2,5g
- * EDTA (verséne).....0,2g
- * Tampon PBS.....1.000ml

Procéder à une filtration stérilisante sur filtre millipore à 0,22µ

- Tampon PBS
- Solution HANKS
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Alcool 96°

- Ether

Préparation des cellules Hep2 :

Toutes les opérations doivent être faites stérilement sous hotte à flux laminaire.

1-Décongélation des cellules :

- Retirer une ampoule de cellules HEP2 du container a azote liquide et la mettre dans un bain marie à +37°C.
- Après décongélation, transférer stérilement le contenu de l'ampoule dans un tube à centrifuger à 2000 T/mn pendant 3 minutes.
- Jeter le surnageant et remettre en suspension le culot cellulaire dans du milieu.
- Transvaser la suspension dans un flacon de culture de 25 cm², puis rajouter du milieu en quantité suffisante (10 a 15ml).
- Incuber le flacon à +37°C dans une étuve sous atmosphère contenant 5% de CO₂.
- Après 24 heures d'incubation, remplacer le milieu par du milieu frais et re-incuber le flacon a l'étuve pendant 48 heures.
- **2-Préparation de bio- masse cellulaire :**
- Après 48 heures d'incubation, vider le flacon de culture. Ajouter 1ml de solution de trypsine –Verséne et bien en imbibe le tapis cellulaire en imprimant au flacon des mouvements latéraux lents et réguliers.
- Vider le flacon puis remettre 1 ml de solution de trypsine –Versene et opérer dans les mêmes conditions que précédemment.
- Laisser agir 30 sec. a température de laboratoire, puis remettre le flacon a l'étuve à + 37°C jusqu' au détachement complet du tapis cellulaire que l'on doit constater en examinant le flacon toute les 2 à 3 minutes.
- Rajouter 10 ml de milieu de bien et homogénéiser la suspension cellulaire en secouant le flacon fortement a plusieurs reprises.
- Repartir la suspension dans deux flacons de culture de 25 cm², ajouter dans chaqu un d eux 10 ml de milieu et incuber à +37°C pendant 48 heures.

3-Culture sur lames :

- Trypsiner un flacon de culture, comme indique précédemment, et préparer 10 de suspension cellulaire dans du milieu.
- Placer les lames a alvéoles dans les boites de pétri carrées stériles et, à raison de 5 lames par biote.
- Déposer stérilement, dans chaque alvéole, une goutte de suspension cellulaire puis refermer les biotes.
- Incuber 48 heures à +37°C sous atmosphère contenant 5% de CO₂.
- Contrôler les lames a microscope pour s'assurer de l'existence d un tapi cellulaire.
- Aspirer le milieu a laide d une pipette reliée à une trompe a vide.
- Rincer les lames 3 fois avec la solution de HNKS.
- Procéder a la fixation des lames en les plongeant dans l'acétone, préalablement portée à - 20°C et les garder a cette température durant 8 heures.
- Retirer les lames a l'acétone, et les remettre à sécher pendant 3 à 4 minutes sous ventilation d' air frais. Les lames ainsi fixées peuvent être utilisées immédiatement ou être congelées à - 70°C jusqu'a emploi

4)Congelation des cellules Hep 2 :

- Trypsiner un flacon de culture ,comme indiqué précédemment ,et préparer 10 ml de suspension cellulaire dans du milieu enrichi à 10% de SVF
- Preparer dans un flacon stérile placé dans de la glace pilée une solution A contenant :

DMEM complémenté

Sérum de veau foetal

DMSO

- Mettre dans flacon stérile

Solution A

SUSPENSION CELLULAIRE

aliquoter dans des ampoules 0 congélateur 0 -70degre cell pd 3 h environ ,puis les conserver dans un container d'azote liquide

Annexe V :

Tableau II : Principaux anticorps mouchetés.

Images	Anticorps détectés Cibles	Maladies associées
Moucheté à grains irrégulières	Anti-RNP U1snRNP (RNP 70, A, C)	Connectivite mixte LED
	Anti-Sm U1-U6 snRNP (SmD)	
Moucheté à grains fins et denses	Anti-SSA Y1-Y5 RNP (SSA 60, SSA 52)	Lupus cutané LED
	Anti-SSB Y1-Y5 RNP	Gougerot SjôSgren
Moucheté pléomorphique	Anti-PCNA Cycline	LED
Moucheté Ponctué	Anti-centromères CENP B	Syndrome de CREST CBP
	Dots nucléaires (2 à 6) Coilin p80	CBP Gougerôt SjôSgren

Annexe VI:**Tableau II : Principaux anticorps anti-nucléoles.**

Aspect	Antigène	Pathologie
Homogène	Nucléoline	LED, sclérodermies, hépatite A
	PM/ScI (PM1)	Sclérodermies-polymyosites
	To ou Th	Sclérodermies limitées
	Nucléophosmine	Sclérodermies, maladie du greffon Contre l'hôte, LED et SA secondaire
Granulaire	Fibrillarine	Sclérodermies
Moucheté	Topoisomérase I (Sc1-70)	Sclérodermies
	RNA polymérase	
	NOR 90	
NOR 90 <i>nucleolar organizing region</i> , SAP : syndrome des anti-phospholipides		

Annexe VII:Tableau 3 :Associations cliniques en fonction de la cible des *antineutrophil cytoplasmique antibodies*

Antiègne	Aspect	Clinique
PR3	c-ANCA	Vascularite Glomurélonéphrite nécrosant pauci-immune GNPI
MPO	p-ANCA	Vascularite GNPI ; syndrome Goodpasture
Lamp 2	c/p-ANCA	Vascularite ;GNPI
BPI	A/c-ANCA	Vascularite,polyarthrite,Lupus,Cholangite, Sclérosante,hépatite auto- immune,infection,.....
Cathepsine G	A/p-ANCA	Vascularite,colite ulcératione, polyarthrite, Cholangite,hépatite auto-immune.
Elastase	a/p-ANCA	Vascularite, colite ulcératione, Cholangite sclérosante,
Lactoferrine	a/p-ANCA	colite ulcératione, polyarthrite, Cholangite,hépatite auto-immune

Annexe VIII :

Groupes à risque de Maladie Cœliaque

Il existe un risque accru de MC chez les apparentés au premier degré de malades cœliaques (10 à 20 %). Près de 70 % des malades atteints de dermatite herpétiforme ont une atrophie villositaire, même silencieuse. Le risque de MC est également augmenté chez les sujets atteints de diabète insulino-dépendant (5 %) ou d'autres maladies auto-immunes (thyroïdite, psoriasis, vitiligo, ataxie etc.) et chez les malades atteints de trisomie 21.

Une MC asymptomatique est présente chez 1 à 5 % des malades souffrant d'une ostéoporose idiopathique qui est parfois la seule manifestation de la malabsorption intestinale du calcium et de la vitamine D.

les noms FREEA
les adresses
les numéros de B
les dates

