

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb Blida-1  
Faculté de Médecine



جامعة سعد دحلب بلديّة-1  
كلية الطب

Département de Pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en pharmacie

**Intitulé :**

**Etude comparative entre la technique  
immunofluorescence indirecte et la technique immuno-  
enzymatique ELISA dans la recherche des anticorps  
antinucléaires**

**Présenté et soutenu par :**

**Session MAI 2019**

ABDI Nesrine  
CHADI Youcef

**Jury d'évaluation :**

Président du jury :	<b>Pr BOUCHEDOUB. Y</b>	Professeur en immunologie
Examineur :	<b>Dr RACHEDI .N</b>	Assistante en immunologie
Examineur :	<b>Dr BENREBHA.N</b>	Assistante en immunologie
Encadreur :	<b>Dr BABASACI. R</b>	Maître assistante en immunologie

Année universitaire 2018 – 2019



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb Blida-1  
Faculté de Médecine



جامعة سعد دحلبج البليدة-1  
كلية الطب

Département de Pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en pharmacie

**Intitulé :**

**Etude comparative entre la technique  
immunofluorescence indirecte et la technique immuno-  
enzymatique ELISA dans la recherche des anticorps  
antinucléaires**

**Présenté et soutenu par :**

**Session MAI 2019**

ABDI Nesrine  
CHADI Youcef

**Jury d'évaluation :**

Président du jury :	<b>Pr BOUCHEDOUB. Y</b>	Professeur en immunologie
Examineur :	<b>Dr RACHEDI .N</b>	Assistante en immunologie
Examineur :	<b>Dr BENREBHA.N</b>	Assistante en immunologie
Encadreur :	<b>Dr BABASACI. R</b>	Maître assistante en immunologie

Année universitaire 2018 – 2019

# بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

،،الحياة ليست سهلة لأي منا. ولكن، مهما يكن يجب أن تكون  
مثابرا، وواثقا من نفسك. عليك أن تؤمن بأنك جيد في  
شيء ما، وأنه يجب عليك تحقيقه بأي ثمن”

-ماري كوري-

---

# REMERCIEMENT

---

Nous tenons de remercier en premier lieu notre Dieu qui nous a donné la force, la santé et la volonté pour accomplir ce travail.

Nous voudrions adresser toutes nos gratitudees à notre Encadreur de mémoire, Madame Rima BABASACI. On la remercie d'avoir nous encadré, orienté, aidé et conseillé.

Nos remerciements vont également au président de jury le Professeur BOUCHEDOUB. Y de nous avoir honoré en présidant ce jury.

Docteurs RACHEDI. N et BENREBHA. N sont vivement remerciées d'avoir examiné ce travail, et faire partie de ce jury et enrichir le débat scientifique.

On remercie également toute l'équipe pédagogique de l'Université de Saad Dahleb Blida-1 et les intervenants professionnels responsables de notre formation.

On voudrait aussi exprimer nos reconnaissances envers nos familles, amis et collègues qui ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de notre cursus.

Nous tenons à remercier toute personne qui a participé de près ou de loin à l'exécution de ce modeste travail.

Merci...

## Dédicace

---

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance...

Je dédie cette Thèse...

A mes chers parents *CHADI Abdelghani* et *SERRADI Hafidha* qui ont œuvré pour ma réussite, de par leur amour, leur soutien, tous les sacrifices consentis et leur précieux conseils, pour toute leur assistance et présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mon frère *Elmahdi* et ma sœur *Amina*, qui m'ont soutenue et encouragée. Je leurs souhaite tout le bonheur du monde.

Au mémoire de mes grands-parents *SIDI MOUSSA Zerouk* et *SERRADI Rachid* que Dieu ait pitié de vous et que vos revenus soient généreux, vous resterez toujours dans mon modèle et ma fierté

A monsieur *HASSIB Benaissa* merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, je te prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mes sincères remerciements. Je prie dieu le tout puissant pour qu'il te donne bonheur et prospérité.

A mon binôme et amie « *ABDI Nesrine* » qui m'a soutenu, on a partagé des moments inoubliables pendant ce travail.

Je le dédie aussi à mesamis et collègues avec qui j'ai partagé les meilleurs moments, et à mes enseignants qui m'ont aidé à tracé le chemin de réussite.

Merci d'être toujours là pour moi.

*Chadi Youcef*

## Dédicace

---

Aux cinq piliers de ma vie, je dédie mon travail...

A toi ma mère *MOULLA-MOSTEFA Bachira*, qui as choisi de sacrifier tes propres rêves dans le but de voir les nôtres se réaliser, tu as toujours été une héroïne à mes yeux ; et à toi mon père *ABDI Hamid* qui as consacré toute ta vie, tes efforts et ta santé pour nous voir grandir et réussir. A vous je dois tout accomplissement car ce n'est que grâce à votre amour et bienveillance que je suis arrivée jusqu'ici.

A mes deux frères *Mohamed* et *Youssef*, sur lesquels je pouvais toujours compter. Vous m'avez souvent inspiré et je vous ai toujours admiré.

A ma sœur *Nadjet*. Tu as su être une oreille attentive, tout en me conseillant dans mes choix et en m'encourageant.

Ainsi, à ma petite princesse *Serine, Ayes, Tamim*, la petite *Aline*, et mes belles sœurs *Sarah* et *Amina*, et mon beau-frère *Salim*

*ABDI Nesrine*

# PLAN

---

<b>INTRODUCTION</b> -----	<b>2</b>
<b>I. CHAPITRE : AUTO-IMMUNITE</b> -----	<b>5</b>
I.1 La discrimination entre le soi et le non soi -----	5
I.2 Tolérance immunitaire du soi -----	5
I.2.1 Tolérance centrale :-----	5
I.2.2 Tolérance périphérique : -----	6
I.2.3 Mécanismes d'immuno-régulation complémentaires :-----	6
I.3 Définition de la pathologie auto-immune -----	7
I.4 Epidémiologie des maladies auto-immunes -----	7
I.5 <b>PHYSIOPATHOLOGIE DES MALADIE AUTO-IMMUNES</b> -----	<b>8</b>
I.5.1 Facteurs de risques :-----	8
I.5.2 Mécanismes de rupture de la tolérance-----	10
I.5.3 Mécanismes lésionnels -----	14
I.6 Classification des maladies auto-immunes[2] -----	14
I.7 Diagnostic des maladies auto-immunes systémiques -----	15
<b>II. CHAPITRE : LES ANTICORPS ANTINUCLEAIRES AAN</b> -----	<b>17</b>
II.1 HISTORIQUE-----	17
II.2 DÉFINITION-----	18
II.3 STRUCTURE-----	18
II.4 Rôle des AAN dans la pathogénie des MAI systémiques : -----	19
II.4.1 Production des AAN[17]:-----	19
II.4.2 AAN dans la genèse des lésions : -----	19
II.5 Rôle comme biomarqueurs des connectivites-----	21
II.5.1 Dépistage :-----	21
II.5.2 Interprétation : -----	21
II.5.3 Identification [33]:-----	22
II.5.4 Signification clinique :-----	22
II.6 Valeur diagnostique des principales spécificités-----	23
II.6.1 AAN anti-antigènes nucléaires insolubles-----	23
II.6.2 AAN anti-antigènes nucléaires solubles -----	24
II.6.3 Les anticorps anti-centromère : -----	25
II.6.4 Les anticorps anti membrane nucléaire : -----	25
II.6.5 Les anticorps d'aspect dots nucléaires[8] : -----	25
<b>III. CHAPITRE : AUTO-ANTIGENES NUCLEAIRES</b> -----	<b>26</b>

III.1	Définition -----	26
III.2	CARACTÉRISATION structurale et fonctionnelle -----	27
III.2.1	ADNdb :-----	27
III.2.2	Histones :-----	27
III.2.3	Nucléosome -----	27
III.2.4	Centromère :-----	28
III.2.5	U1-snRNP et Sm : -----	29
III.2.6	Ro/SSA et La/SSB-----	29
III.2.7	PCNA -----	30
III.2.8	Scl-70-----	31
III.3	Caractéristiques des auto-épitopes des auto-antigènes nucléaires reconnus par les AAN au cours des MAI systémiques[51]-----	32
III.4	Importance des Antigènes dans la méthode de recherche des auto-anticorps[52] :-----	33
III.4.1	Types d'antigènes utilisés dans les techniques de recherche des AAN : -----	34
III.4.2	Méthodes d'utilisation des antigènes dans les techniques de recherche des AAN-----	36
<b>IV.</b>	<b>CHAPITRE : RECHERCHE DES AAN-----</b>	<b>39</b>
IV.1	Indications de la recherche des auto-anticorps antinucléaires :-----	39
IV.2	Techniques de recherche des auto-anticorps antinucléaires -----	39
IV.2.1	Technique radioimmunologique[53]-----	39
IV.2.2	Technique immunodot Dot-Blot[54]-----	40
IV.2.3	Technique immunofluorescence indirecte IFI [9] -----	42
IV.2.4	Technique immuno-enzymatique ELISA[63]-----	47
IV.2.5	Technologie Luminex®-----	50
	<b>Objectifs de l'étude-----</b>	<b>54</b>
<b>V.</b>	<b>CHAPITRE : MATERIELS ET METHODES -----</b>	<b>55</b>
V.1	Matériels : -----	55
V.1.1	Matériels biologiques : -----	55
V.1.2	Matériels non biologiques :-----	56
V.2	Méthodes :-----	56
V.2.1	Stratégie de détection d'AAN au niveau du laboratoire d'immunologie Hassiba-BENBOUALI :-----	56
V.2.2	Dépistage et identification d'AAN :-----	57
V.2.3	Mode opératoire -----	58
V.2.4	Interprétation et limites des tests -----	60
V.3	Critères de jugement : -----	65
<b>VI.</b>	<b>CHAPITRE : Résultat et discussions -----</b>	<b>66</b>

VI.1	Répartition des patients selon le sexe : -----	66
VI.2	Répartition des patients selon l'âge : -----	66
VI.3	Répartition des patients selon les signes cliniques : -----	67
VI.4	Répartition des patients selon la présence d'AAN : -----	68
VI.5	Répartition des patients présentant des AAN positifs selon le sexe : -----	69
VI.6	Répartition des patients présentant des AAN positifs selon l'âge : -----	70
VI.7	Répartition des patients selon la détection d'AAN par technique IFI et technique ELISA : ---	72
VI.8	Répartition des patients selon l'aspect et le titre retrouvés par IFI : -----	75
VI.8.1	Aspects et titres chez tous les patients positifs par IFI : -----	75
VI.8.2	Répartition selon l'aspect et le titre des patients présentant des AAN positifs par IFI et négatifs par ELISA : -----	77
VI.9	Répartition des patients selon la présence des cibles antigéniques : -----	78
VI.9.1	Cible antigénique la plus fréquente : -----	78
VI.9.2	Répartition des patients à cible antigénique monospécifique : -----	79
VI.9.3	Cible antigénique non détectées par la technique IFI sur Hep-2 -----	81
VI.9.4	Cible antigénique non détectées par la technique ELISA -----	83
VI.9.5	Patients présentant des AAN positifs dans le screening par les deux techniques à spécificités non identifiées : -----	85
VI.10	Problèmes rencontrés au cours de la réalisation de pratique -----	85
VI.10.1	IFI : -----	85
VI.10.2	ELISA -----	86
VI.11	Evaluation économique : -----	86
<b>Conclusion -----</b>		<b>87</b>
<b>REFERENCES -----</b>		<b>89</b>
<b>ANNEXES -----</b>		<b>93</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure I-1 Représentation schématique des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux impliqués dans la pathogénie des MAI [22]-----	10
Figure I-2 Apoptose dans le cas physiologique (à gauche) et pathologique (à droite)[14, 17]--	11
Figure I-3 Eléments impliqués dans la rupture de la tolérance du soi -----	13
Figure II-1 structure et différents isotypes d'anticorps-----	18
Figure II-2 Genèse des lésions au cours des MAI systémiques par dépôt des complexes immuns (exemple du LES) -----	20
Figure II-3 conduite à tenir en presence d'AAN -----	22
Figure III-1 Présentation au système immunitaire d'épitopes cryptiques ou de protéines modifiées lors d'un processus apoptotique (à gauche) et Modifications post-traductionnelles des protéines reconnues par certaines populations d'auto-anticorps (à droite)[37]-----	26
Figure III-2 Structure d'histone -----	27
Figure III-3 rôle de nucléosome dans le compactage de l'ADN-----	28
Figure III-4 Figure III-4 structure de centromère -----	28
Figure III-5 Structure de U1-snRNP/Sm -----	29
Figure III-6 Structure de Ro/SSA , La/SSB-----	29
Figure III-7 structure d'Antigène nucléaire des cellules en prolifération PCNA -----	30
Figure III-8 Mécanisme de rôle de PCNA dans les neutrophiles[48]-----	31
Figure III-9 Rôle de ADN topoisomérase I -----	31
Figure III-10 Distribution des épitopes sur l'antigène -----	33
Figure III-11 Principaux procédés d'immobilisation des antigènes dans les techniques en phase solide.-----	38
Figure IV-1 principe de la technique radio-immunologique [55] -----	40
Figure IV-2 Principe de l'immunodot-----	41
Figure IV-3 Figure IV-4 : principe de technique immunofluorescence indirecte -----	43
Figure IV-4 Photos de quelques aspects à grossissement x400-----	46
Figure IV-5 principe du test ELISA -----	48
Figure IV-6 Description de Luminex -----	50
Figure IV-7 Principe de Luminex -----	51
Figure V-1 Stratégie de détection d'AAN au niveau du laboratoire d'immunologie Hassiba-BENBOUALI -----	57
Figure VI-1 Répartition des patients selon le sexe-----	66
Figure VI-2 Répartition des patients selon l'âge-----	66

Figure VI-3 Répartition des patients selon la présence d'AAN-----	68
Figure VI-4 Répartition des patients étudiés et AAN positif selon le sexe -----	69
Figure VI-5 Répartition des patients ayant des AAN positifs selon l'âge-----	70
Figure VI-6 Répartition de la sensibilité et la spécificité d'IFI et d'ELISA -----	72
Figure VI-7 Aspects des patients IFI positifs-----	75
Figure VI-8 Fréquence des titres sur IFI HEp-2 -----	75
Figure VI-9 Titres des patients ELISA négatif sur IFI HEp-2 -----	77
Figure VI-10 Fréquence d'aspects sur IFI HEp-2 des patients ELISA négatifs -----	77
Figure VI-11 Fréquence des différents cible antigéniques -----	78
Figure VI-12 Patients à cible antigénique monospécifique et résultats sur IFI Hep-2-----	79
Figure VI-13 Patients à cible antigénique monospécifique et résultats sur ANA ELISA-----	80

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 Mécanisme de tolérance des lymphocytes B[17] -----	6
Tableau I-2 Distribution géographique des maladies auto-immunes[19] -----	8
Tableau I-3 Association maladies auto-immunes et gènes HLA [1] -----	9
Tableau I-4 Classification des maladies auto-immunes[14]-----	15
Tableau I-5 Critères diagnostiques de référence du lupus systémique définis par l’American College of Rheumatology (ACR)[27]. -----	16
Tableau II-1 Aspects des AAN en IFI sur cellule HEp2 et maladies associées[33] -----	21
Tableau II-2 Proportion de patients AAN positifs pour diverses maladies inflammatoires [34] -----	22
Tableau II-3 auto-anticorps associés aux connectivites [33] -----	25
Tableau III-1 tableau récapitulatif des auto-antigènes nucléaires avec leurs structures et fonctions biologiques [21, 50]-----	32
Tableau III-2 Antigènes recombinants disponibles pour la recherche des autoanticorps antinucléaires. 36	
Tableau IV-1 Avantages et inconvénients de la technique Radioimmunologique[54]-----	40
Tableau IV-2 Avantages et inconvénients d’immunodot -----	42
Tableau IV-3 Avantage et inconvénients de technique immunofluorescence indirecte -----	45
Tableau IV-4 Avantages et inconvénients de la technologie LUMINEX -----	52
Tableau V-1 Les différents tests réaliser dans l’étude -----	57
Tableau V-2 Avantages et inconvénients d’ELISA -----	59
Tableau V-3 Avantages et inconvénients d’IFI-----	60
Tableau VI-1 Répartition selon le motif de demande -----	67
Tableau VI-2 Répartition des patients AAN positifs selon chaque tranche d’âge -----	71
Tableau VI-3 Sensibilité et spécificité de l’ELISA -----	72
Tableau VI-4 Sensibilité et spécificité de l’IFI HEp-2 -----	73
Tableau VI-5 Comparaison de la performance de l’IFI et l’ELISA dans la détection des AAN -----	73
Tableau VI-6 Aspects et titres chez tous les patients positifs par IFI -----	76
Tableau VI-7 Comparaison de l’ELISA et IFI pour détection de sérums à spécificité identifiée -----	82
Tableau VI-8 Répartitions selon les cibles antigéniques, taux, titres et aspects des patient AAN négatifs par ELISA positifs avec IFI -----	83
Tableau VI-9 Prix des kit ANA-ELISA et IFI Hep-2-----	86

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AAN</b>	Anticorps antinucléaire	<b>MAI</b>	maladie auto immune
<b>Ac</b>	Anticorps	<b>MBP</b>	mannan binding protein
<b>ACA</b>	Anticorps anti-centromère	<b>MBL</b>	mannan-binding lectin
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology	<b>MCTD</b>	mixed connective tissue disease
<b>ADCC</b>	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	<b>MPO</b>	Myélopéroxydase
<b>ADNdb</b>	acide désoxyribonucléique double brin	<b>NK</b>	natural killer
<b>Ag</b>	Antigène	<b>PBS</b>	phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin)
<b>AIRE</b>	auto immune regulator	<b>PCNA</b>	Antigène nucléaire des cellules en prolifération
<b>ANCA</b>	anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles	<b>RIA</b>	RadioImmunoAssay
<b>APRIL</b>	A proliferation-inducing ligand	<b>SAPL</b>	syndrome d'antiphospholipides, anticoagulant circulant
<b>ARN</b>	acide ribonucléique	<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>BAFF</b>	B-cellactivating factor	<b>SDS- PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate -PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.
<b>CBP</b>	cirrhose biliaire primitive	<b>SGS</b>	syndromeGoujerot-Sjögren
<b>CD</b>	cluster de différenciation	<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>CENP- A</b>	protéine centromérique A	<b>TNF</b>	tumornecrosis factor
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>TSH</b>	Thyroidstimulatinghormon
<b>CMV</b>	Cytomégalovirus	<b>UV</b>	ultra violet
<b>CRP</b>	protéine C réactive	<b>VP</b>	Vrai positif
<b>CPA</b>	cellule présentatrice d'antigène	<b>VN</b>	Vrai négatif
<b>CREST</b>	calcinose sous-cutanée, syndrome de Raynaud, atteinte oesophagienne, sclérodactylie, télangiectasies	<b>FP</b>	Faux positif
<b>EBV</b>	Epstein Barr virus	<b>FN</b>	Faux négatif
<b>ELISA</b>	Enzyme- LinkedImmunoSorbentAssay	<b>VPP</b>	Valeur prédictive positive
<b>ENA</b>	Extractablenuclearantigen	<b>VPN</b>	Valeur prédictive négative
<b>FAN</b>	facteurs antinucléaires		
<b>GP210</b>	glycoprotéine 210		
<b>HEp-2</b>	Human epithelialcell line type 2		
<b>HLA</b>	Humanleukocyteantigen		
<b>HRP</b>	HorseRadish Peroxydase		
<b>IFI</b>	immunofluorescence indirecte		
<b>IFN</b>	Interféron		
<b>IL</b>	Interleukine		
<b>KDa</b>	Kilodalton (unité international pour mesurer le poid moléculaire des protéines)		
<b>LB</b>	lymphocyte B		
<b>LED</b>	lupus érythémateux disséminé		
<b>LES</b>	lupus érythémateux systémique		
<b>LT</b>	lymphocyte T		

## GLOSSAIRE

- ❖ **Anticorps (Ac) :** Protéine produite par les LB et capable de se lier de façon très spécifique à une molécule particulière, appelée, antigène, contre lequel elle est dirigée. Un Ac reconnaissant un Ag X est appelé Ac anti-X. Chez tout individu, il existe des milliers d'Ac différents, chacun d'entre eux présentant un site de liaison à l'Ag unique. Les Ac sécrétés assurent différentes fonctions, notamment la neutralisation des Ag, l'activation du complément, la stimulation de la phagocytose et la destruction des microbes.
- ❖ **Antigène (Ag) :** Initialement, ce terme s'appliquait à toute molécule qui induisait la production d'Ac spécifiques par les LB. Il est maintenant étendu à toute molécule qui est reconnue de façon spécifique par un Ac ou un récepteur d'Ag des LT ou LB. Il s'agit le plus souvent de protéines ou de peptides (fragments de protéines).
- ❖ **Auto-anticorps :** Ac spécifique d'un Ag du soi. Les auto-Ac peuvent provoquer des lésions cellulaires et tissulaires, et sont produits en excès dans différentes maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux disséminé.
- ❖ **Auto-immune (maladie) :** Maladie provoquée par une rupture de tolérance au soi, entraînant une réponse du système immunitaire contre les Ag du soi et déclenchant des lésions cellulaires et tissulaires. Les maladies auto-immunes peuvent être spécifiques d'organes (par exemple le diabète de type I) ou systémique (par exemple le lupus érythémateux disséminé).
- ❖ **Cellule :** Unité de base du vivant. L'Homme est constitué d'environ 50 000 milliards de cellules. Il en existe quelques centaines de types différents (neurones, cellules cardiaques, hématies, cellules musculaires, hépatocytes, lymphocytes...) qui participent toutes au fonctionnement de l'organisme.
- ❖ **Clone :** Ensemble de cellules issues d'une même cellule, génétiquement identiques entre elles et à la cellule mère d'origine.
- ❖ **CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) :** Les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (aussi appelé HLA chez l'Homme, pour Human Leucocyte Antigen)

sont des protéines participantes très activement dans les réactions immunitaires. Leur fonction essentielle est de présenter des Ag peptidiques aux LT. Elles sont codées chez l'Homme par plusieurs groupes de gènes dont les gènes de classe I (HLA-A, -B, -C) et les gènes de classe II (HLA-DP, -DQ et -DR). L'ensemble de ces gènes est regroupé au niveau du chromosome 6p21. Ces gènes sont extrêmement polymorphes, c'est à dire qu'il existe un très grand nombre d'allèles pour chacun d'entre eux. Les protéines du CMH de classe I sont présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme alors que les molécules du CMH de classe II ne sont exprimées qu'à la surface de certaines cellules, les CPA (LB, macrophages, cellules dendritiques par exemple).

- ❖ **Complexe immunitaire** : Complexe formé par l'association d'un Ac et de l'Ag contre lequel il est dirigé. Les complexes immunitaires permettent l'élimination de l'Ag par certains globules blancs (phagocytes) mais ils peuvent, en fonction de leur taille, se déposer sur la paroi des vaisseaux sanguins et causer des lésions.
- ❖ **Co-stimulation** : Phénomène produit par un médiateur soluble (cytokine) ou par contact ligand/ récepteur qui entraîne l'activation optimale d'une fonction cellulaire. Les phénomènes de co-stimulation sont des signaux complémentaires importants lors de la réponse immunitaire pour l'activation des LB et LT. En leur absence, la reconnaissance de l'Ag par les LT conduit à leur anergie ou lieu de provoquer leur activation.
- ❖ **ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay)** : Méthode de quantification d'Ag immobilisé sur une surface solide ; elle requiert un Ac spécifique couplé de manière covalente à une enzyme. La quantité d'Ac qui se lie aux Ag est proportionnelle à la quantité d'Ag présent. Cette quantité est déterminée par spectrométrie qui mesure la conversion de substrat incolore en un produit coloré par l'enzyme couplée à l'Ac.
- ❖ **Épitope** : Petite séquence spécifiquement reconnue par le BCR (épitope B) ou par le TCR (épitope T).
- ❖ **Immunofluorescence** : Technique permettant la détection d'une molécule au moyen d'un Ac marqué par un fluorochrome. Par exemple : en microscope de fluorescence, les cellules qui expriment un Ag de surface particulière peuvent être colorées à l'aide d'un Ac conjugué à la fluorescéine et spécifique de l'Ag, puis visualisé au microscope à l'inflorescence.

- ❖ **Immunogénicité** : Une molécule est dite immunogène si elle est capable d'induire une réponse immunitaire. Les Ag microbiens sont immunogènes. Beaucoup d'Ag protéiques ne sont pas immunogènes et nécessitent des adjuvants pour déclencher une réponse immune.
- ❖ **Immunoglobuline (Ig)** : Protéine produite par les LB et capable de se lier spécifiquement à un Ag donné. Les Ig existent sous deux formes : soit insérées dans la membrane du LB (Ig de surface), en tant que récepteur de l'Ag (BCR), soit sécrétées par les plasmocytes (Ac), en charge de neutraliser l'Ag circulant. On dénombre cinq classes différentes d'Ig (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM) exerçant chacune une fonction effectrice caractéristique.
- ❖ **Inflammation** : Réaction complexe d'un tissu vascularisé à une infection, toxine ou à lésion tissulaire qui implique une accumulation extravasculaire de protéines plasmatiques et de leucocytes. Une inflammation aiguë est une conséquence fréquente de réponse immunitaire innée, des réponses immunitaires adaptatives locales pourront ainsi induire de l'inflammation. Alors que celle-ci exerce une fonction protectrice en contrôlant les infections et en favorisant la cicatrisation des tissus, elle peut également être à l'origine de lésion tissulaire et de maladies.
- ❖ **Interférons (IFN)** : Cytokines capables d'interférer dans le processus infectieux des virus, de bloquer leurs répliquions intracellulaires. L'IFN- $\gamma$  en activant les macrophages, les rend plus efficaces dans l'élimination des microbes phagocytés. Les IFN de type 1 induisant une résistance à l'infection virale et la répliquion (état antiviral) ; ils comprennent plusieurs formes d'IFN- $\alpha$  et une forme d'IFN- $\beta$ .
- ❖ **Interleukine (IL)** : Protéine produite par les cellules de l'immunité (globules blancs) transmettant aux LB et LT un message immunitaire important, ce qui est sa signification étymologique (message inter-leucocytes, c'est-à-dire entre les globules blancs). Il existe aujourd'hui une trentaine d'IL connues, portant chacune un numéro qui lui est propre. Ils font partie de la famille des cytokines. Une même IL peut avoir des appellations différentes car elle peut avoir été découverte par différentes équipes de chercheurs mais actuellement des comités internationaux ont pour mission d'homogénéiser la nomenclature en ne retenant qu'une appellation. Pour les IL, on peut citer deux d'entre elles qui sont d'importance dans les maladies inflammatoires :
  - L'interleukine 1 (IL-1) est un médiateur de l'inflammation qui est aussi capable d'induire la destruction du cartilage et de l'os dans certaines maladies comme la PR.

- L'interleukine 6 (IL-6) est une puissante cytokine de l'inflammation (elle déclenche la synthèse par le foie de protéines de phase aigüe comme la CRP, protéine C-réactive) mais a aussi d'autres actions (production d'Ac par les LB, différenciation des LT CD4 par exemple).
- ❖ **Leucocyte** : Terme général désignant les globules blancs comprenant les lymphocytes, granulocytes (ou polynucléaires) et monocytes.
- ❖ **Ligand** : Substance capable de se fixer sur une protéine soluble (enzyme par exemple) ou sur un récepteur membranaire et de déclencher une réaction chimique (transformation d'un substrat en produit dans le cas des enzymes) ou une réponse cellulaire (différenciation, prolifération, mort, synthèse de molécules effectrices).
- ❖ **Lymphocyte B (LB)** : Cellule de l'immunité adaptative dont la fonction essentielle est de produire des Ac mais elle exerce aussi d'autres fonctions immunitaires, notamment de présentation de l'Ag.
- ❖ **Lymphocyte B auto-réactif (ou auto-agressif)** : LB peuvent être auto-réactifs ou auto-agressifs, c'est-à-dire produire des auto-Ac d'affinité variable.
  - Les LB auto-réactifs produisant des auto-Ac de faible affinité sont « physio logiques », présents chez tout le monde ;
  - Les LB peuvent devenir auto-agressifs, c'est-à-dire produire des auto-Ac de forte affinité. Ce sont ces auto-Ac qui sont décrits dans les MAI et qui parfois exercent des effets pathogènes directs. L'apparition de ces auto-Ac s'explique par différents phénomènes de maturation mais aussi par un défaut de sélection qui permet aux LB auto-agressifs de survivre et proliférer. Outre la production d'auto-Ac, ces LB auto-agressifs ont d'autres particularités (présentation d'auto-Ag, production de cytokines...) qui participent à la pathogénie des MAI.
- ❖ **Lymphocyte** : Variété de globules blancs qui intervient dans la réponse immunitaire de l'organisme. Il existe deux sortes de lymphocytes : les LB et les LT. Chaque lymphocyte est spécifique d'un seul Ag c'est-à-dire qu'il n'est activé que par un seul Ag.
- ❖ **Mimétisme moléculaire** : Mécanisme inducteur d'auto-immunité qui est déclenché par un agent microbien contenant des Ag imitant des Ag de soi, de manière telle que les réponses immunitaires contre ce microbe entraînent des réactions contre les tissus de soi.

- ❖ **Peptide** : Molécule constituée de l'enchaînement de 2 à 50 acides aminés pouvant jouer le rôle d'hormone ou de neurotransmetteur. La succession ou l'assemblage de plusieurs peptides constitue une protéine.
  
- ❖ **Peptide antigénique** : Fragment de protéine endogène (propre à un individu) ou exogène (étrangère à un individu) reconnu par le système immunitaire.
  
- ❖ **Plasmocyte** : LB ayant atteint un stade ultime de maturation et dont la fonction est de produire des Ac après activation par l'Ag.
  
- ❖ **Sélection** : Ensemble des réactions permettant l'éducation des LT et LB à reconnaître et distinguer le soi et le non-soi.
  
- ❖ **Sérum** : Liquide exempt de cellules qui reste après la coagulation du sang. Le plasma contient en plus les facteurs de la coagulation. Les Ac sanguins se trouvent dans le sérum.

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

Les maladies auto-immunes surviennent si la rupture de la tolérance du soi entraîne des lésions cellulaires ou tissulaires induites par des lymphocytes T et/ou des lymphocytes B produisant des auto-anticorps spécifiques d'auto-antigènes[1]. Les maladies auto-immunes sont fréquentes (prévalence : 5%) et sont la troisième cause de mortalité et morbidité dans les pays développés. Elles sont classées en deux groupes : MAI spécifiques, et non spécifiques d'organes ou systémiques[1, 2].

Les MAI systémiques peuvent se manifester par une symptomatologie très pauvre au début, ne touchant parfois qu'un organe, ou très polymorphe ne permettant pas toujours d'orienter d'emblée le clinicien. L'orientation clinique est aussi difficile dans les syndromes de chevauchement [3, 4]. Le diagnostic des MAI systémiques est par conséquent basé sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques[5]. En cas de suspicion d'une connectivité, la recherche des anticorps antinucléaires (AAN) doit être faite[3], en deux étapes, avec un test de dépistage suivi, en cas de positivité, d'une technique d'identification spécifique. Ce test présente un réel intérêt dans le diagnostic et parfois le pronostic des connectivites et des hépatopathies auto immunes[6], permettant une prise en charge thérapeutique adaptée, ce qui nécessite une parfaite maîtrise de la stratégie du dépistage[7].

La détection des AAN, peut s'effectuer par de nombreuses techniques : immunofluorescence indirecte (IFI), immuno-enzymologie, radio-immunologie... Toutefois, en l'absence de techniques standardisées, les résultats dépendent des techniques utilisées, notamment de leur reproductibilité surtout dans le cas d'une manipulation manuelle, des conditions de réaction (tampon, incubation, dilution), de la nature des antigènes (natifs purifiés, recombinants, peptides de synthèse) ainsi que de leur qualité (pureté, stabilité, configuration moléculaire), du mode d'adsorption des antigènes sur le support (puits ELISA, microbilles, bandelettes nitrocellulose) et de la spécificité du conjugué (anticorps polyvalent, anti-IgG). Il existe par conséquent un risque de faux négatifs et de faux positifs, fonction de la sensibilité et spécificité des techniques[8].

L'immunofluorescence indirecte sur cellules *Human Epithelial Cell-2* (HEp-2) se pratique avec des antigènes natifs, offrant une bonne spécificité[8, 9]. Toutefois, La qualité de ce dépistage est très dépendante du substrat utilisé, son mode de fixation et de conservation, de la subjectivité de la lecture, de plus l'interprétation est difficile en présence de plusieurs auto-

anticorps, et elle manque de sensibilité pour la détection des anti-SSA(60kDa)[9-11]. Elle est cependant la technique la plus utilisée en routine pour le dépistage des AAN car elle permet la mise en évidence d'un grand nombre d'entre eux selon l'aspect révélé, mais il est le plus souvent nécessaire d'identifier les cibles par des méthodes de confirmation[8, 12].

Les performances analytiques des techniques immuno-enzymatiques dont l'*enzyme linked immuno assay* (ELISA) varient selon l'antigène utilisé et les conditions techniques. L'ANA-ELISA offre une bonne spécificité mais la sensibilité est variable[8].

L'interprétation du bilan auto-immun consiste à apprécier la cohérence des résultats entre les techniques de dépistage et les techniques d'identification d'une part et le contexte clinique d'autre part[5]. Les résultats de ces tests peuvent cependant ne pas être cohérents. La fiabilité de ces techniques est de ce fait, mise en question.

En vue de déceler la méthode la plus fiable pour la recherche des AAN, on présente dans ce mémoire une étude comparative entre les deux techniques les plus utilisées dans ce domaine, l'immunofluorescence indirecte sur cellules Hep-2 et l'ELISA, réalisée sur une série de 348 patients suivis au niveau du CHU Hassiba BENBOUALI Blida.

**SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

# I. CHAPITRE : AUTO-IMMUNITÉ

## I.1 La discrimination entre le soi et le non soi

En 1897, le microbiologiste allemand Paul Ehrlich a découvert une des caractéristiques fondamentales du système immunitaire : son pouvoir de discriminer le soi du non-soi. Par l'expression "horror autotoxicus", il était le premier à définir la capacité du système immunitaire à rejeter les substances étrangères tout en laissant intactes les structures de l'organisme. Ehrlich postulait alors que toute anomalie dans la reconnaissance du soi et du non-soi pouvait déclencher l'apparition d'une réaction immunitaire contre un ou plusieurs des constituants de l'organisme, entraînant sa destruction. Ehrlich venait de définir la pathologie auto-immune. La capacité de discriminer le soi du non soi est un processus actif acquis dans les organes lymphoïdes primaires, moelle osseuse hématopoïétique et thymus (tolérance centrale) puis parachevé en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires (tolérance périphérique)[2].

## I.2 Tolérance immunitaire du soi

En théorie, compte tenu des réarrangements des différents gènes des BCR ou des TCR, le répertoire immunitaire est formé d'un très grand nombre de récepteurs, cette grande richesse de répertoire explique que de nombreux récepteurs peuvent répondre et reconnaître des antigènes propres ou identiques à des molécules de l'organisme[13]. Trois mécanismes de tolérance permettent au système immunitaire de se protéger contre ces clones auto réactifs, de les contrôler ou de les inactiver :

### I.2.1 Tolérance centrale :

Correspond à l'éducation au niveau thymique des lymphocytes T et à l'éducation au niveau de la moelle osseuse des lymphocytes B. Cette tolérance centrale apparaît dès le stade embryonnaire et permet d'effectuer une sélection, positive et négative, qui va éliminer les clones auto réactifs (destruction cellulaire, modification des récepteurs de co-stimulation)[13, 14]. Elle est due à la présentation des antigènes du soi au niveau central au cours de la phase prénatale et une courte période postnatale, ce qui joue un rôle décisif dans la prévention d'une auto-immunité[14]. Le facteur AIRE assure cette présentation au niveau thymique et sa mutation provoque l'apparition du syndrome APECED[15].

### I.2.2 Tolérance périphérique :

Quand un auto antigène n'est pas exprimé dans le thymus, les cellules T autoréactives échappent à la sélection négative[14, 16]. Leur contrôle dépend donc de mécanismes de tolérance périphériques, qui correspondent à l'éducation, durant toute la vie de la maturation des lymphocytes. Elle implique principalement trois mécanismes: la délétion par apoptose; l'anergie par absence de signaux de costimulation dont les molécules sont manquants en effet dans les cellules de la plupart des organes, de sorte que leur reconnaissance par un TCR n'induit pas de réponse immunitaire; et enfin l'ignorance des cellules T auto-réactives vis à-vis de leurs antigènes observée quand l'antigène est «caché» (extravasculaire ou intracellulaire) ou quand il est présenté par des cellules présentatrices non professionnelles[14].

### I.2.3 Mécanismes d'immuno-régulation complémentaires :

La production de cytokines anti-inflammatoires, d'anti-cytokines (récepteurs de cytokines relargués ) et du réseau idiotypique (autoanticorps naturels qui représentent 30 % environ des anticorps circulants) joue un rôle primordial dans le contrôle des réactions immunitaires et inflammatoires[13].

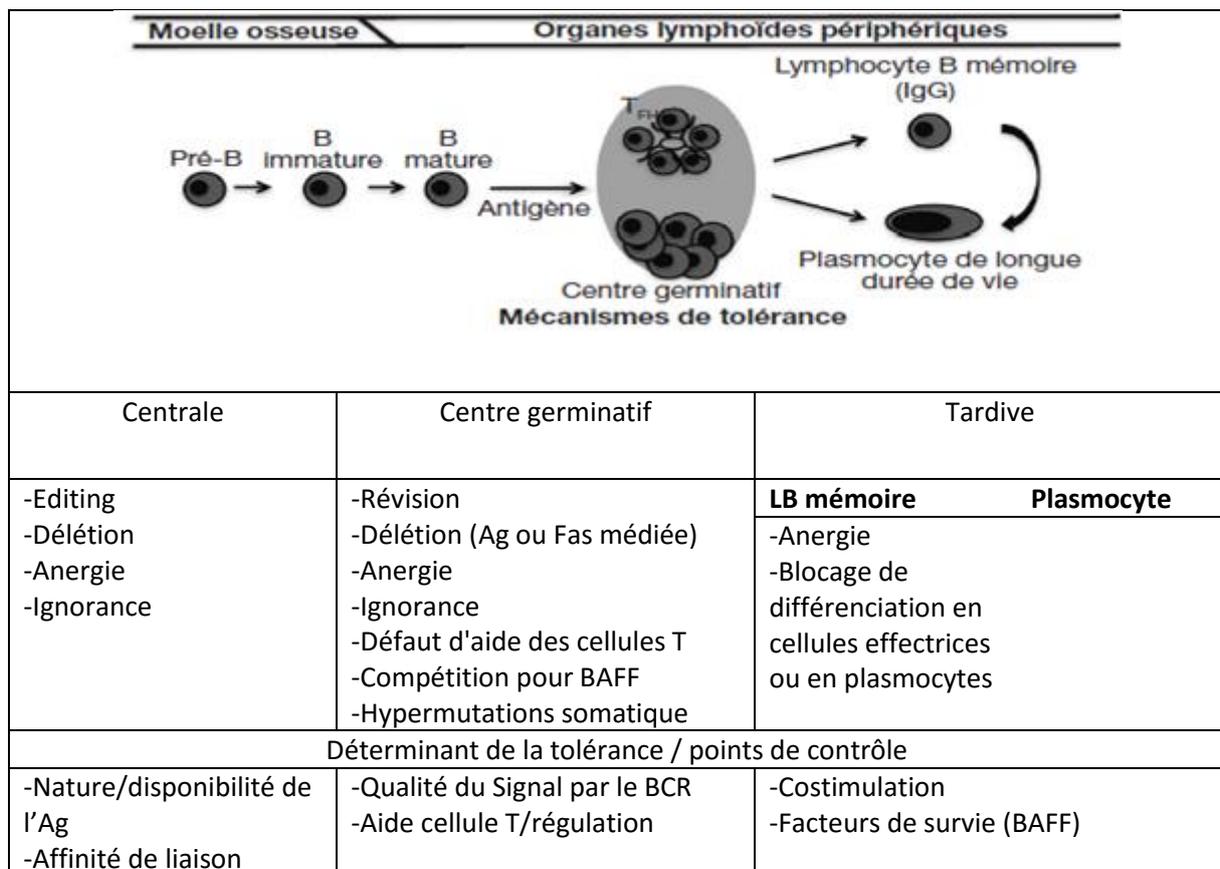


Tableau I-1 Mécanisme de tolérance des lymphocytes B[17]

### **I.3 Définition de la pathologie auto-immune**

L'auto-immunité est la rupture des mécanismes de tolérance du soi suite à une défaillance des systèmes de régulation immunitaire[2, 13]. Les clones B et T auto-réactifs de faible affinité sont physiologiquement présents mais contrôlés[13]. Par contre, au cours des pathologies auto-immunes, une prolifération de lymphocytes B et T auto-agressifs de forte affinité est observée[13]. Une maladie auto-immune se déclare alors, lorsque l'organisme déclenche une réponse immunitaire adaptative délétère à l'encontre d'un ou plusieurs constituants du soi, entraînant une symptomatologie clinique en rapport avec la spécificité de la réponse auto-immune[2]. Les Maladies Auto-immunes (MAI) sont des maladies multifactorielles qui ne peuvent être définies que sur un ensemble de critères cliniques et biologiques déterminés, parmi lesquels le titre des auto-anticorps est fondamental[16].

### **I.4 Epidémiologie des maladies auto-immunes**

La prévalence des maladies auto-immunes est estimée entre 5% et 10% de la population mondiale[18]. La polyarthrite rhumatoïde est la plus fréquente des MAI non spécifiques d'organes avec pour 100000 habitants, une prévalence de 200-700, et incidence annuelle <20 en Europe du sud ; et une prévalence de 900 en Afrique subsaharienne ; pour le syndrome de Gougerot-Sjögren et le lupus érythémateux systémique (LES), la prévalence et l'incidence annuelle sont respectivement 200-600, 30-70 et 4-5, 2 pour 100000 en Europe du sud[19]. A notre connaissance, aucune donnée statistique officielle n'est disponible en Algérie.

Les données épidémiologiques prouvent une constante croissance dans l'incidence des MAI dans les sociétés occidentalisées au cours des dernières décennies[20].

Les MAI non spécifiques d'organes peuvent survenir à tout âge et touchent préférentiellement les femmes représentant 75% des patients. Le sex-ratio du syndrome Gougerot-Sjögren par exemple est de 10 femmes pour un homme[18].

Maladies	Prévalence (incidence annuelle) pour 100,000									
	Am Nord	Am Centre	AmSud	Eur Nord	Eur Sud	Eurouest	Eur Est	Moyen orient	Asie	Afrique
<b>PR</b>	600-1,000 (40)	400-2,000	155-500	400-900 (20-40)	200-700 (<20)	500-900 (10-50)	700	200-500	100-800 (40-90)	900
<b>Lupus</b>	20-50 (1-2)	50-60	(Brésil9)	20-70 (2-7)	30-70 (2)	40 (5)	N/D	N/D	20-70 (3)	Rare
<b>S.Sjögren</b>	320 (4)	N/D	N/D	N/D	200-3,000	200-600 (4-5)	N/D	N/D	Inde rare Chine 330-700	N/D
<b>Sclérodermie</b>	13-28 (2)	N/D	N/D	<10 (<1)	10-30 (<2)	15	N/D	N/D	<10	23 (2)

Tableau I-2 Distribution géographique des maladies auto-immunes[19]

## I.5 PHYSIOPATHOLOGIE DES MALADIE AUTO-IMMUNES

### I.5.1 Facteurs de risques :

La conjonction de plusieurs facteurs environnementaux et génétiques rend le développement de la maladie possible[17]. Les principaux facteurs de risques incriminés au cours des MAI sont :

#### I.5.1.1 Facteurs de risque génétiques :

Bien qu'il existe très peu de maladies auto-immunes monogéniques, elles ont toutes une composante génétique. On note souvent une association ou une liaison avec divers marqueurs génétiques[2].

##### I.5.1.1.1 Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ; HLA chez l'Homme)

L'association HLA-maladie auto-immune peut s'expliquer par l'aptitude particulière de certains allèles HLA à présenter certains auto-antigènes aux lymphocytes T. Le CMH est impliqué aussi au niveau central dans la présentation des auto-antigènes lors de la sélection positive. Parmi les exemples les plus marquants d'association entre allèle HLA et maladie auto-immunes, on peut citer l'allèle HLA-B27 présent chez plus de 95 % des patients atteints de spondylarthrite ankylosante. D'autres maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, le diabète, la maladie cœliaque ou la sclérose en plaques sont associées à des allèles HLA de classe II, sans que ces associations n'atteignent le niveau observé avec la spondylarthrite ankylosante[2].

Maladie auto immune	Allèle HLA associé
Sclérose en plaques, Syndrome Goodpasture	HLA-DR2
Hépatites auto immunes	HLA-DR3
Polyarthrite rhumatoïde, Pemphigus	HLA-DR4
Diabète type 1	HLA DR3/DR4
Spondylarthrite ankylosante	HLA-B27
Maladie cœliaque	HLA DQ2/DQ8

Tableau I-3 Association maladies auto-immunes et gènes HLA [1]

#### I.5.1.1.2 Autres gènes impliqués

Le génotype HLA n'est pas le seul facteur génétique de prédisposition à l'auto-immunité. Les jumeaux monozygotes qui ont en commun l'ensemble de leurs gènes ont en effet beaucoup plus de risques de développer la même maladie auto-immune que des jumeaux dizygotes qui partagent le même génotype HLA. Ceci démontre que d'autres gènes peuvent intervenir dans la prédisposition à la maladie. Parmi ces facteurs, on peut citer les gènes du complément dont le déficit est associé au lupus, des récepteurs aux fragments constants (Fc) des immunoglobulines, des récepteurs de mort, des cytokines, des récepteurs Toll ou les gènes codant les enzymes de synthèse des hormones stéroïdiennes[2, 16].

#### I.5.1.2 Facteurs de risque environnementaux :

Bien que l'événement déclenchant de la réponse auto-immune ne soit élucidé pour la pluparts des MAI, il a été supposé qu'un facteur exogène en soit responsable[21]. Cela est argumenté par l'auto-immunité chimiquement induite et la constatation que l'incidence des maladies auto-immunes n'est pas la même chez les jumeaux monozygotes et est dépendante de la localisation géographique des malades et de leur mode de vie[2].

##### I.5.1.2.1 Micro-organismes

Les agents infectieux ont été suspectés en être impliqués pour certaines observations comme la constatation d'une séropositivité antivirus d'Epstein-Barr (EBV) significativement fréquente chez des patient atteints de sclérose en plaque et de polyarthrite rhumatoïde[16]. Plus récemment, l'implication des récepteurs Toll-like7 et 9 et de l'interféron  $\alpha$ , stimulés au décours d'infections virales, dans la physiopathologie des connectivites a renforcé cette association[2, 17]. Dans les études épidémiologiques, les virus les plus fréquemment impliqués dans la genèse ou l'exacerbation de poussées lupiques sont le parvovirus B19, le cytomégalovirus (CMV) et

l'Epstein-Barr virus (EBV), via l'altération des réponses immunitaires et l'induction de la production d'AAN[17].

#### I.5.1.2.2 Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques incriminés sont :

- Les radiations UV en cause de la photosensibilité des patients lupiques[17].
- Les médicaments comme le procainamide ou l'hydralazine et la quinidine induisant *de novo* un lupus dit médicamenteux. Ainsi des médicaments haptènes comme la quinine inductrice de thrombopénie auto-immune[2, 17].
- La silice, dont l'exposition a été associée au développement de la sclérodémie systémique[2].
- Le tabac du fait de son action pro inflammatoire[17].
- Le stress[16].

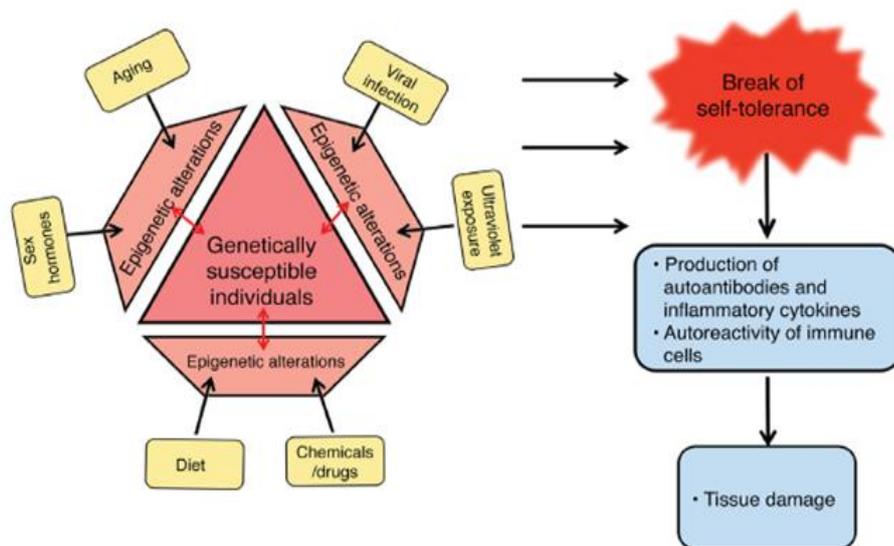


Figure I-1 Représentation schématique des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux impliqués dans la pathogénie des MAI [22]

## I.5.2 Mécanismes de rupture de la tolérance

### I.5.2.1 Anomalies de l'apoptose

L'apoptose est un phénomène physiologique de mort cellulaire programmée via différents récepteurs (Fas et TNF-R1...) primordial pour l'acquisition de la tolérance, centrale par sélection négative dans le thymus des lymphocytes T, et périphérique via la régulation de la prolifération lymphoïde après une stimulation immunitaire. Néanmoins, le corps apoptotique pourrait constituer « l'auto-antigène » impliqué directement dans la rupture de tolérance contre des antigènes nucléaires au cours de certaines MAI systémiques suite à un défaut quantitatif de l'apoptose additionné à un défaut qualitatif de la clairance des corps apoptotiques[17].

Dans le LES notamment l'apoptose accélérée des lymphocytes et des monocytes rapportée pourrait être responsable de l'augmentation des quantités de nucléosomes circulants[23]. Il en va de même de l'irradiation UV qui induit une apoptose importante des kératinocytes. Les petites vésicules apoptotiques ou « blebs » ainsi relarguées sont riches en ribonucléoprotéine SS-A (Ro)[24].

Le déficit en complément (C1q, C4, MBL), ou la saturation des mécanismes de clairance par augmentation de la charge en corps apoptotiques provoquent une accumulation de corps apoptotiques susceptibles de se transformer en corps nécrotiques alors capables d'induire une réaction inflammatoire avec production d'IL-1, de TNF- $\alpha$  et d'IL-12 provoquant la différenciation des cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigènes qui vont activer les lymphocytes T et B auto-réactifs[17]. Par ailleurs, la modification de certaines protéines du soi par le processus d'apoptose (clivage, oxydation, phosphorylation) est à l'origine de leur immunogénicité[25]. Ces anomalies d'apoptose aboutissent à une disponibilité constante d'auto-antigènes responsable en partie du développement de la réponse auto-immune[25].

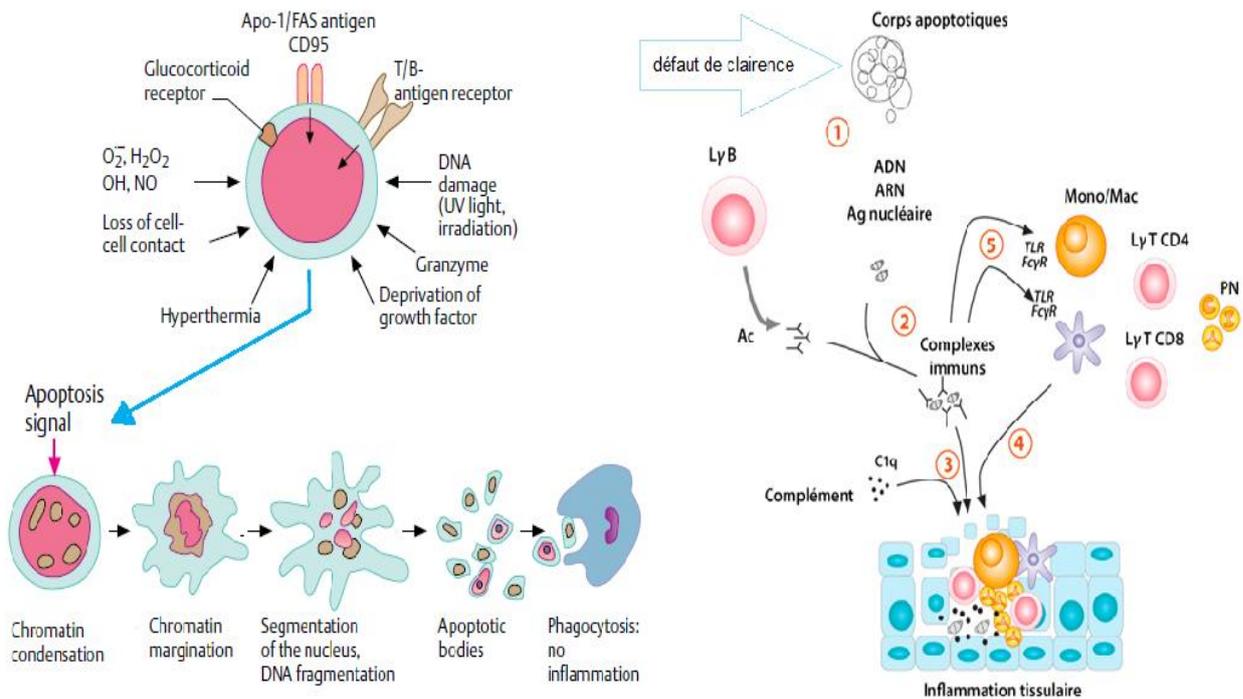


Figure I-2 Apoptose dans le cas physiologique (à gauche) et pathologique (à droite)[14, 17]

### **I.5.2.2 Défaillance des mécanismes régulateurs**

On connaît des mécanismes cellulaires et humoraux de maintien de la tolérance[14].

Des déficits dans le nombre ou dans les fonctions des lymphocytes régulateurs ont été prouvés au cours de maladies auto-immunes[1].

Les anticorps anti-idiotypiques reconnaissent des déterminants des régions hypervariables d'autres anticorps et forment, selon N. Jeme, un réseau idiotypique contribuant à la tolérance. Selon cette théorie, la perte d'anticorps anti-idiotypes ou une dominance d'auto-anticorps pathogéniques perturbe le réseau et entraîne une perte de tolérance[14].

### **I.5.2.3 Activation des lymphocytes auto-réactifs anergiques lors des infections par mimétisme moléculaire ou par expression aberrante des molécules CMH II**

Certains antigènes d'un agent infectieux viral ou bactérien peuvent partager des épitopes communs avec des antigènes du soi. Ainsi, certaines infections virales sont parfois associées au déclenchement ou à l'exacerbation de maladies auto-immunes. Dans ces cas, l'agent infectieux présente simultanément des épitopes identiques à ceux d'auto-antigènes de l'organisme infecté, et des épitopes qui lui sont propres. Ces derniers entraînent une réponse immunitaire vigoureuse car les lymphocytes T spécifiques d'antigènes du microorganisme ne sont pas tolérants. La réponse immunitaire qui se développe favorise la présentation des déterminants auto-antigéniques dans un contexte propice à la levée de l'anergie des lymphocytes T auto-réactifs (expression de molécules de costimulation par la cellule présentatrice d'antigène, production de cytokines par les lymphocytes T auxiliaires spécifiques d'épitopes xénogéniques)[1].

Un grand nombre de maladies auto-immunes sont accompagnées par une expression de molécules du CMH de classe II sur des cellules normalement classe II négatives. Ce phénomène d'expression « aberrante » de molécules du CMH peut être causé par l'interféron gamma. L'événement initial est la reconnaissance de cellules infectées par un virus par des lymphocytes T spécifique, ces derniers sécrètent l'interféron gamma qui induit l'expression de molécules du CMH de classe II sur d'autres cellules non infectées. La présentation de peptides auto-antigéniques par ces molécules de classe II exprimées de façon aberrante peut avoir pour résultat leur reconnaissance et même leur destruction par des cellules T autoréactives[14].

### I.5.2.4 Activation des lymphocytes auto-réactifs ignorants par auto-antigène séquestré ou cryptique

Certaines régions du corps ne sont pas accessibles au système immunitaire, ou séquestrées. En cas de rupture de cette séquestration par des blessures ou des inflammations graves, le système immunitaire peut accéder aux tissus qui risquent alors d'être considérés comme étrangers[14].

Par ailleurs des épitopes cryptiques présents au sein d'auto-antigènes, vis-à-vis desquels les cellules lymphoïdes n'ont pas acquis de tolérance, peuvent susciter une réaction auto-immune si, à l'occasion d'une réaction inflammatoire, ils se trouvent présentés par les molécules du CMH. C'est le cas, par exemple, de certains peptides cryptiques de la protéine basique de la myéline dans la sclérose en plaques[1].

### I.5.2.5 Défaut de délétion des lymphocytes auto-réactifs

Plusieurs études ont montré que le couple Fas/FasL est impliqué dans la délétion périphérique des clones T autoréactifs et dans la délétion des lymphocytes T activés par un antigène exogène. Les mutations des gènes Fas et FasL des souris MRL sont associées à un phénotype auto-immun avec levée de l'anergie des lymphocytes B auto-immuns qui se caractérise par un syndrome de type lupique[1].

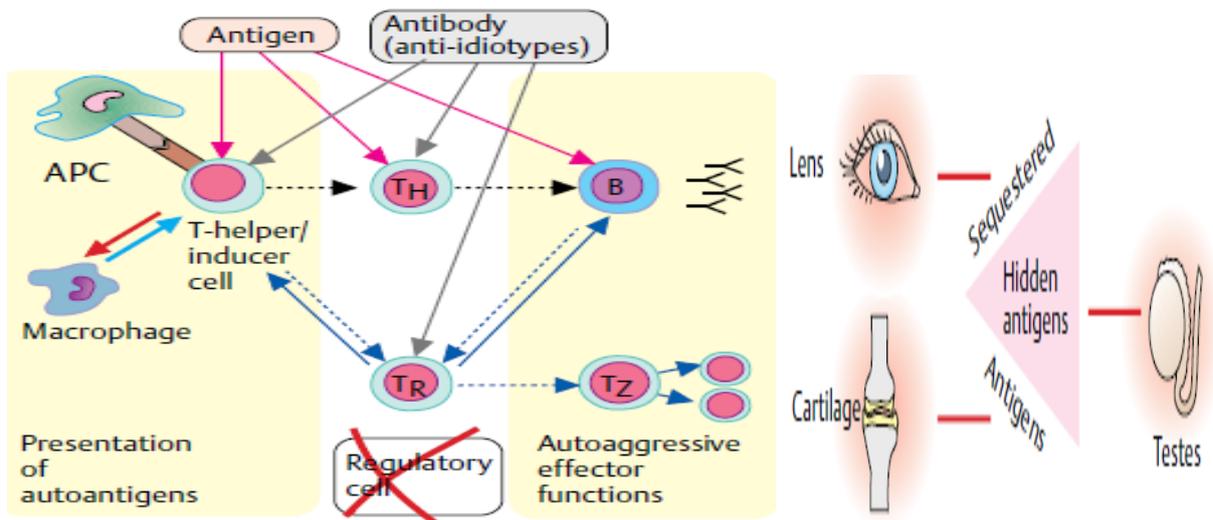


Figure I-3 Eléments impliqués dans la rupture de la tolérance du soi

### **I.5.3 Mécanismes lésionnels**

Il existe deux types de mécanismes physiopathologiques auto-immuns : humorale et cellulaire[1].

#### **I.5.3.1 Effecteurs humoraux [1, 17] :**

Les auto-anticorps induisent des lésions par :

##### **I.5.3.1.1 Induction d'une cytolysse de la cellule cible :**

La cytolysse cellulaire induite par les auto-anticorps peut être réalisée par :

- activation du complément ;
- opsonisation et phagocytose par des cellules monocytaires/macrophagiques ;
- cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) par cellules *natural killer* (NK)

##### **I.5.3.1.2 Modification de la fonctionnalité de l'antigène cible :**

C'est le cas des anticorps anti-facteur intrinsèques, anti-récepteurs de l'acétylcholine dans la myasthénie, et anti-récepteurs de la TSH dans la maladie de basedow.

##### **I.5.3.1.3 Formation de complexes immuns :**

La formation et le dépôt de complexes immuns circulants au niveau tissulaire conduisent à l'activation du complément, des cellules dendritiques, et autres cellules immunitaires induisant des lésions inflammatoires. Les glomérulonéphrites lupiques par exemple, sont causées par une réponse inflammatoire suite au dépôt des complexes immuns au niveau du glomérule[17].

#### **I.5.3.2 Les effecteurs cellulaires [1, 2] :**

Les lymphocytes T CD4 peuvent participer à la réaction inflammatoire par la synthèse de cytokines ou exercer un pouvoir cytotoxique direct par l'expression de récepteurs de mort. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8 peuvent induire des lésions cellulaires par l'exocytose de molécules cytotoxiques ou l'engagement de récepteurs de mort conduisant à l'apoptose.

### **I.6 Classification des maladies auto-immunes[2]**

Les lésions tissulaires qui découlent de la réponse auto-immune dépendent de la localisation de l'autoantigène. 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 maladie auto-immune spécifique d'organe. En revanche, si l'autoantigène est largement distribué dans l'organisme, les lésions sont disséminées au sein de différents tissus et on parle de maladie auto-immune non spécifique d'organe (tableau I.4) .

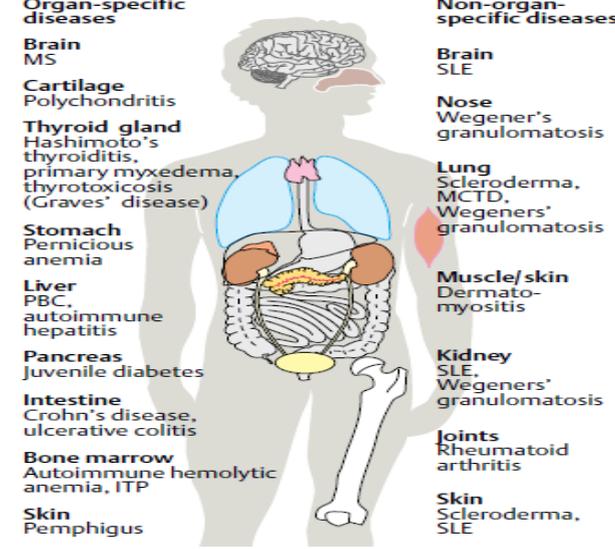
Exemples de maladies auto-immunes spécifiques d'organe	Exemples de maladies auto-immunes systémiques	Localisation des lésions au cours des différentes MAI
Diabète de type 1 Thyroïdite auto-immune Hépatopathies auto-immunes Myasthénie Maladies bulleuses auto-immunes Vitiligo Uvéïte auto-immune Rétinite auto-immune	Vasculrite primitive Polychondrite atrophiante Lupus érythémateux systémique Syndrome de Gougerot-Sjôgren Polyarthrite rhumatoïde Sclérodémie systémique Myosites auto-immunes Connectivite mixte	 <p><b>Organ-specific diseases</b></p> <p><b>Brain</b> MS</p> <p><b>Cartilage</b> Polychondritis</p> <p><b>Thyroid gland</b> Hashimoto's thyroiditis, primary myxedema, thyrotoxicosis (Graves' disease)</p> <p><b>Stomach</b> Pernicious anemia</p> <p><b>Liver</b> PBC, autoimmune hepatitis</p> <p><b>Pancreas</b> Juvenile diabetes</p> <p><b>Intestine</b> Crohn's disease, ulcerative colitis</p> <p><b>Bone marrow</b> Autoimmune hemolytic anemia, ITP</p> <p><b>Skin</b> Pemphigus</p> <p><b>Non-organ-specific diseases</b></p> <p><b>Brain</b> SLE</p> <p><b>Nose</b> Wegener's granulomatosis</p> <p><b>Lung</b> Scleroderma, MCTD, Wegener's granulomatosis</p> <p><b>Muscle/skin</b> Dermatomyositis</p> <p><b>Kidney</b> SLE, Wegener's granulomatosis</p> <p><b>Joints</b> Rheumatoid arthritis</p> <p><b>Skin</b> Scleroderma, SLE</p>

Tableau I-4 Classification des maladies auto-immunes[14]

## I.7 Diagnostic des maladies auto-immunes systémiques

Les maladies auto-immunes systémiques peuvent toucher tous les tissus de l'organisme. Elles se caractérisent donc par une clinique polymorphe, comprenant le plus souvent des lésions cutanées, des signes articulaires et une atteinte de l'état général associés à un syndrome inflammatoire biologique. Leur diagnostic est un diagnostic d'élimination basé sur l'examen clinique en plus des examens complémentaires tel l'imagerie médicale et la biologie médicale (recherche d'auto-anticorps)[2].

Biologiquement, ils sont associées à certains auto-anticorps dont les anticorps antinucléaires ou facteur anti-nucléaires qui constituent le principal marqueur biologique des maladies auto immunes non spécifiques d'organes en particulier les connectivites[10]. La présence des AAN fait partie des critères diagnostiques de référence de certaines connectivites (tableau I.2); et permet d'orienter et de confirmer le diagnostic différentiel après détermination des spécificités associés aux différentes connectivites[26].

Critères diagnostique du lupus érythémateux systémique
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Éruption malaire en ailes de papillon</li> <li>– Éruption du lupus discoïde</li> <li>– Photosensibilité</li> <li>– Ulcérations buccales et nasopharyngées</li> <li>– Polyarthrite non érosive</li> <li>– Pleurésie ou péricardite</li> <li>– Atteinte rénale : protéinurie &gt; 0,5 g/24 h, cylindres urinaires</li> <li>– Atteinte neurologique : convulsions, psychose</li> <li>– Atteinte hématologique : Anémie hémolytique avec hyperréticulocytose ou leucopénie &lt; 4 000/mm<sup>3</sup> ou lymphopénie &lt; 1 500/mm<sup>3</sup> ou thrombopénie &lt; 100 000/mm<sup>3</sup></li> <li>– <b>Désordres immunologiques :</b> <b>Présence d'anticorps anti-ADN natif, ou d'anticorps anti-Sm, ou d'anticorps anti-phospholipides</b> <b>Présence d'un titre anormal d'anticorps anti-nucléaires</b></li> </ul>

Tableau I-5 Critères diagnostiques de référence du lupus systémique définis par l'American College of Rheumatology (ACR)[27].

## II. CHAPITRE : LES ANTICORPS ANTINUCLEAIRES AAN

### II.1 HISTORIQUE

En avril 1943, l'hématologue Malcolm Hargraves remarque, dans la moelle sternale d'un malade, la présence de cellules particulières appelées cellules LE (lupus érythémateux), constituées de polynucléaires neutrophiles ayant phagocyté le noyau d'une autre cellule.

L'année suivante, John Haserick montra que le sérum des malades lupiques développe un facteur sérique. En 1954, le suisse Peter Miescher réussit à adsorber le facteur sérique avec des noyaux de cellules thymiques de veau, démontrant ainsi que le facteur LE est un anticorps antinucléaire.

En 1957 le français Maxime Seligman montra que le sérum des lupiques provoque un précipité lorsqu'il est superposé à une solution d'ADN. Les anticorps anti-ADN étaient devenus le marqueur sérologique spécifique du lupus ! Du fait de son importance, la recherche des anti-ADN a fait l'objet de nombreux travaux, et de nombreuses techniques ont été proposées.

L'histoire des anticorps antinucléaires va prendre une tournure importante, grâce à George Friou, chef du service des Maladies Infectieuses à l'Hôpital de West Haven dans le Connecticut, qui applique la technique d'immunofluorescence développée en 1953 par Albert Coons. A l'aide d'un éclairage UV et d'une antiglobuline humaine marquée à la fluorescéine.

En 1961, l'anglais J.S. Beck décrit l'existence de différents « patterns », c'est-à-dire de diverses images fluorescentes correspondant à des spécificités différentes des anticorps.

Une très élégante idée a été développée en France, pour la recherche des anticorps anti-ADN, par J. Thivolet en 1965. En utilisant le sang de souris infectées par « *Trypanosoma gambiense* » qui permettent d'identifier, par immunofluorescence, les anticorps anti-ADN car ceux-ci marquent intensément le kinétoplaste des trypanosomes. Ce principe a été modifié par L.A. Aarden (1975) avec un autre protozoaire, le « *Crithidia lucilae* ».

Une autre découverte fait date dans l'histoire des anticorps antinucléaires ; il s'agit de la mise en évidence, en 1961 par l'équipe de J.R. Anderson à Glasgow, dans le sérum des malades atteints du syndrome de Sjögren, d'anticorps précipitant un extrait soluble de divers tissus. C'est le départ des travaux sur les anticorps anti-ENA (*Extractable Nuclear Antigens*). Depuis,

un grand nombre d'anti-ENA ont été caractérisés, certains étant des marqueurs spécifiques des connectivites[28].

## II.2 DÉFINITION

Les anticorps antinucléaires AAN (aussi connus sous le nom de facteur antinucléaire FAN) sont une variété d'auto-anticorps réagissant avec divers constituants du noyau. Leur recherche a un intérêt dans le diagnostic différentiel des connectivites bien qu'ils n'en soient pas spécifiques car ils sont présents également chez des sujets sains, âgés ou au cours de certaines maladies infectieuses et inflammatoires. Ils sont habituellement recherchés en deux temps: après mise en évidence des anticorps antinucléaires totaux, les spécificités sont caractérisées[29].

Wardemann et al. ont démontré que la majorité (55 à 75 %) des anticorps exprimés par les cellules B immatures sont des auto-anticorps polyréactifs dirigés contre des antigènes nucléaires, ces Lymphocytes B immatures dans le cas physiologique acquièrent la tolérance au niveau centrale et périphérique, cependant dans un processus pathologique ils peuvent échapper aux mécanismes de contrôle et participer dans une réponse immunitaire auto-immune humorale par sécrétion d'auto-anticorps anti-nucléaires spécifiques de forte affinité[30].

## II.3 STRUCTURE

Les anticorps antinucléaires sont des protéines appartenant au groupe des gammaglobulines.

Plusieurs isotypes sont généralement simultanément retrouvés dans les sérums des patients atteint d'une connectivité. Dans le cas du Lupus, Gonzalez et Rothfield ont trouvé que les AAN de type IgA sont présents dans 51%, ANA type IgM dans 81%, et AAN type IgG dans 96% des sérums des patients lupiques. Toutefois, seuls les anti-ADNdb d'isotype IgG (de forte affinité) ont un intérêt dans le diagnostic et le suivi du lupus. Une prédominance des sous-classes IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>3</sub> qui ont une plus grande capacité de fixation du complément a été démontrée entre les anti-ADNdb associés au LED. Par contre la classe prédominante des AAN présents dans le liquide synovial des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde semble être la classe IgM (65%) avec présence des AAN classe IgG (35%)[26].

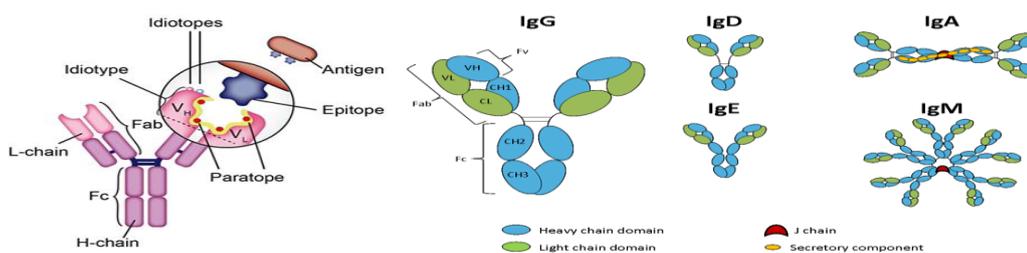


Figure II-1 structure et différents isotypes d'anticorps

## II.4 Rôle des AAN dans la pathogénie des MAI systémiques :

Le fait que les auto-anticorps apparaissent chez certains patients atteints d'une MAI systémique avant le début des symptômes laisse suggérer que cette rupture de tolérance est un événement fondateur dans la physiopathologie de ces maladies mais n'est pas seulement secondaire à leur activité[31].

### II.4.1 Production des AAN[17]:

L'interaction entre des facteurs déclenchant chez un sujet génétiquement prédisposé est à l'origine de l'apparition d'une réponse auto-immune pathogène impliquant l'émergence des lymphocytes auto-réactifs, l'accessibilité des auto-antigènes (corps apoptotiques) aux CPA, et leur présentation aux lymphocytes auto-réactifs aboutissant à la production des AAN. Ainsi, différentes anomalies pouvant contribuer à cette production sont rapportés chez des patients lupiques :

- Une production inappropriée de l'IFN- $\alpha$  favorisant la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B via l'augmentation de la production de BAFF et APRIL et d'auto-antigènes nucléaires.

- Présence des lymphocytes T spécifiques de divers antigènes nucléaires dans le sérum, qui fournissent un signal d'activation aux lymphocytes B pour produire des anticorps de forte affinité (IgG) contre divers épitopes du complexe reconnu (Un clone T CD4 + anti-70U1-RNP peut ainsi aider à produire des anti-Sm)

- surexpression lymphocytaire du CD40L témoignant une hyperactivation du centre germinatif.

### II.4.2 AAN dans la genèse des lésions :

La plupart des anticorps antinucléaires sont dépourvus de toute action pathogène directe, comme en témoignent la présence d'anticorps antinucléaires dans le sérum de sujets normaux et l'impossibilité de transférer passivement la maladie à des sujets volontaires ou à des animaux par le sérum lupique[21].

Cependant la participation de certains AAN dans la physiopathologie du LED est démontrée : les anticorps anti-ADNdb contribuent à l'atteinte rénale et cérébrale et les anticorps anti-SSA sont associés au bloc auriculoventriculaire fœtal. C'est via leur capacité à se lier à des auto-antigènes circulants et à former des complexes immuns que ces anticorps vont devenir pathogènes dans la maladie lupique, en se déposant au niveau des tissus et des vaisseaux où ils vont induire des lésions[17]. Bien que l'implication des AAN dans la genèse de la maladie ne soit établie au cours de toutes les MAI systémiques, leur valeur diagnostique en tant que marqueurs sérologiques de toutes les MAI systémique est sans doute établie[4].

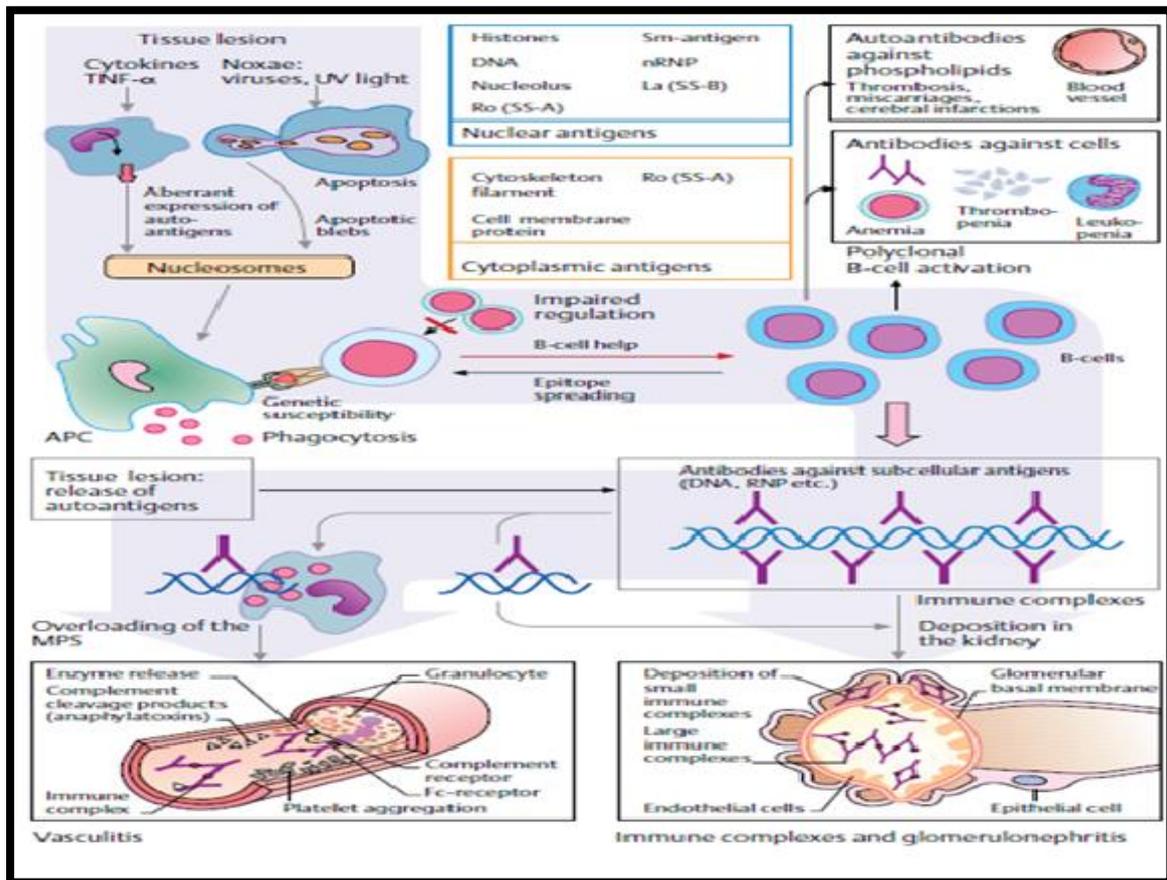


Figure II-2 Genèse des lésions au cours des MAI systémiques par dépôt des complexes immuns (exemple du LES)

## II.5 Rôle comme biomarqueurs des connectivites

Les anticorps antinucléaires (AAN) constituent un excellent test de dépistage de connectivites lorsqu'on les associe à l'évaluation anamnesticque et clinique. Leur valeur diagnostique réside dans leur bonne sensibilité. En raison de la faible spécificité de ce test, la recherche d'anticorps contre différents antigènes nucléaires spécifiques est effectuée dans un deuxième temps[32].

### II.5.1 Dépistage :

L'immunofluorescence indirecte (IFI) est la technique la plus répandue et la plus largement décrite comme test de dépistage des AAN. Elle est considérée comme le gold standard dans les dernières recommandations de l'American College of Rheumatology (ACR)[33].

### II.5.2 Interprétation :

La limite de positivité des AAN dans la plupart des laboratoires est une dilution de 1/80 et le titre d'AAN correspond à la dilution du sérum à laquelle la fluorescence disparaît. Les AAN sont également retrouvée au cours de plusieurs pathologies inflammatoires, ainsi que chez la population générale notamment au-delà de 65 ans avec un titre rarement supérieur à 1/160, il est conseillé donc de répéter le dosage à distance car leur présence à un titre élevé est souvent transitoire[33]. Plus le taux (titre de la dilution) est élevé, plus la présence de ces AAN va devenir significative. Les différents types de fluorescence observée (homogène, mouchetée, nucléolaire, centromérique...) correspondent à différents antigènes nucléaires et ont une valeur d'orientation diagnostique[32].

Aspects	Antigènes	Maladies associées
Homogène	dsDNA, histones, nucléosome	LES, Lupus induit
Moucheté		
• Grossier	RNP, Sm	MCTD, LES
• Moyen	SSA, SSB	Sjögren, LES
• Fin	Scl-70	Sclérodemie
• Discret	Centromère	CREST
Nucléolaire	ARN polymérase I	Sclérodemie

Tableau II-1 Aspects des AAN en IFI sur cellule HEp2 et maladies associées[33]

### II.5.3 Identification [33]:

En cas de positivité significative, orientée par l'aspect observé, une recherche par ELISA des anticorps plus spécifiquement dirigés contre certains antigènes nucléaires, est effectuée (figure II.3) :

-L'aspect homogène : oriente vers la recherche d'anti-ADN natifs, anti nucléosome et anti-histones.

-L'aspect moucheté : motive la recherche d'anticorps anti-antigène nucléaire soluble (anti-ENA) : anti-sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Scl70, anti-snRNP, anti-PCNA. Ce test est réalisé systématiquement chez certains laboratoires pour la recherche d'anti-SSA non détecté parfois par IFI.

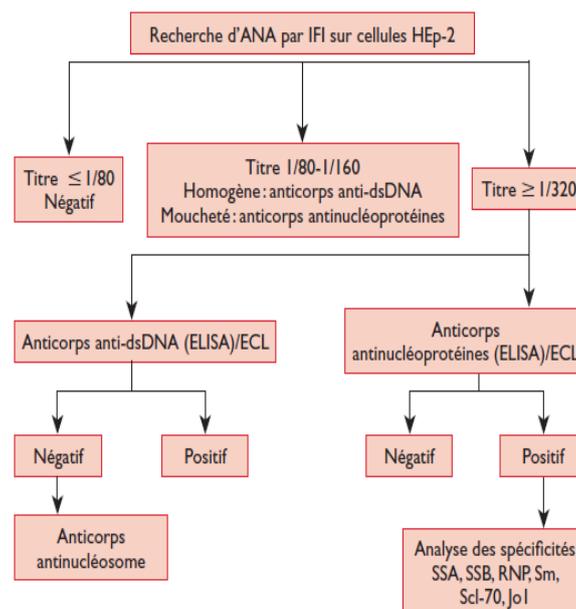


Figure II-3 conduite à tenir en présence d'AAN

### II.5.4 Signification clinique :

Malgré leur faible spécificité, les AAN restent particulièrement utiles dans le diagnostic du LES où ils ont une excellente sensibilité (sensibilité 93%, spécificité 57%), dont ils font partie des critères diagnostiques établis par l'ACR, et également de la sclérodémie systémique (sensibilité 85%, spécificité 54%). Dans ces cas, leur absence devrait faire diriger les recherches vers un autre diagnostic en raison d'une bonne valeur prédictive négative (VPN)[34].

Cependant, les AAN deviennent moins utiles dans le diagnostic d'autres pathologies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, la polymyosite ou la dermatomyosite où ils sont retrouvés seulement dans la moitié des cas. La présence d'AAN positifs, sans clinique évocatrice d'une maladie auto-immune, a une valeur prédictive positive (VPP) très basse [32].

Diagnostics	AAN positifs (%)
<b>Lupus érythémateux systémique</b>	95-100
<b>Lupus induit (médicaments)</b>	100
<b>Syndrome de Sjögren</b>	80-90
<b>Sclérodémie</b>	60-90
<b>Connectivites mixtes</b>	100
<b>Polymyosite</b>	50-75
<b>Polyarthrite rhumatoïde</b>	40-60

Tableau II-2 Proportion de patients AAN positifs pour diverses maladies inflammatoires [34]

## II.6 Valeur diagnostique des principales spécificités

### II.6.1 AAN anti-antigènes nucléaires insolubles

#### II.6.1.1 Les anticorps anti-ADN natif (dsDNA):

Les anti-ADN natif (double brin) ont une grande valeur diagnostique dans le lupus érythémateux disséminé (LED), retrouvés chez 90% des patients avec corrélation du titre avec l'évolutivité de la maladie[8]. Bien qu'ils n'en soient pas strictement spécifiques. Ils s'observent en effet, quoique rarement, au cours de la polyarthrite rhumatoïde, du syndrome de Sharp (connectivite mixte), du syndrome de Gougerot-Sjögren, du SAPL, des hépatopathies auto-immunes et médicamenteuses. Dix à 30 % des formes débutantes de LED n'ont pas d'anticorps anti-dsDNA détectables. Cette absence peut être transitoire, d'où la nécessité de renouveler leur recherche dans le temps[35].

Ils sont identifiés par plusieurs techniques :

- le test de Farr met en évidence des Ac de forte affinité (IgG), très spécifiques ;
- l'IFI sur *Crithidia luciliae* détecte également des Ac de forte affinité (IgG), mais est moins sensible ;
- l'ELISA retrouve des Ac de faible (IgM) et forte affinité (IgG) ; bien que moins spécifique, c'est la technique la plus utilisée aujourd'hui[8].

#### II.6.1.2 Les anticorps anti histones

Les cibles de ces anticorps sont les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4. Elles peuvent être identifiées par Elisa ou western-blot. Ils sont fréquemment retrouvés dans le LES, mais aussi dans d'autres MAI et au cours d'infections[8]. Ils ont un intérêt pour le diagnostic de lupus induit par les médicaments (notamment les formes induites par la procainamide, la quinidine ou la D-pénicillamine), avec un intérêt tout particulier accordé à la spécificité anti-complexe H2A/H2B. Cette réactivité n'est cependant pas spécifique du lupus induit[35].

#### II.6.1.3 Les anticorps anti nucléosomes :

Ils sont retrouvés chez 70 à 90 % des patients lupiques, le plus souvent associés aux Ac anti-ADN natif. Ils sont surtout utiles au diagnostic des LES sans anti-ADN natif. Par ailleurs, un titre élevé (par technique Elisa ou Dot) est évocateur d'une atteinte rénale[8].

## **II.6.2 AAN anti-antigènes nucléaires solubles**

### **II.6.2.1 Les anticorps anti-snRNP**

Il s'agit d'anticorps dirigés contre Les anticorps anti-U1 snRNP, retrouvés dans le syndrome de *SHARP* (100 % des patients), le LES (30 %), la PR (15 %), les sclérodermies, ils sont de bon pronostic lorsqu'ils sont isolés[8].

### **II.6.2.2 Les anticorps anti-Sm**

Ils sont fréquemment associés aux anticorps anti-U1snRNP[8]. Ils sont spécifiques du LES (10-20 %) et persistent pendant les rémissions[29, 36].

### **II.6.2.3 Les anticorps anti-Ro/SSA (Ro60)**

Ils sont très fortement associés au SGS (70 %) et au LES (30 %). Parfois, les AAN sont négatifs ; de fait, les Ac anti-SSA/Ro doivent être recherchés devant un contexte clinique particulier (SGS, LES, grossesse)[8]. Ils sont de mauvais pronostic lorsqu'ils sont isolés et ont une valeur diagnostique dans :

- les LED sans anticorps anti-dsDNA ;
- le lupus subaigu marqué par des lésions cutanées des zones photo exposées et une atteinte de la muqueuse buccale ;
- le lupus néonatal et le bloc auriculo-ventriculaire congénital[35].

Détectés par IFI sur cellules HEp2000 et par ELISA[11].

Les Ac anti-SSA52 (TRIM21) ne sont pas spécifiques des connectivites[8].

### **II.6.2.4 Les anticorps anti-La/SSB**

Dirigés contre d'une protéine phosphorylée de 48 kD couplée à des ARN transcrits par l'ARN polymérase III. Ils s'observent dans 10 à 90 % des syndromes de Gougerot-Sjögren presque toujours associés aux anti-Ro/SSA ainsi que dans 5 à 20 % des LED et au cours du lupus néonatal[29].

### **II.6.2.5 Les anti-PCNA (proliferating cellnuclear antigen)**

D'aspect caractéristique en IFI (moucheté, 1/3 des cellules positives), ils sont retrouvés dans le LES il est présent chez moins de 5 % des LES et caractérise une atteinte rénale grave ou neurologique[8, 29].

### **II.6.2.6 Les anticorps anti-Sc170**

L'aspect de fluorescence est généralement mixte, homogène nucléolaire ; ils sont détectés le plus souvent au cours des sclérodermies systémiques diffuses (20-60 % des cas) et sont de mauvais pronostic, associés à des complications pulmonaires[8].

### II.6.3 Les anticorps anti-centromère :

L'aspect de fluorescence est caractéristique sur cellules HEp-2 montrant une fluorescence de la plaque équatoriale en métaphase (ce qui requiert des cellules en division). Les Ac anti-protéines centromériques, B, C sont retrouvés dans 60 à 80 % des sclérodermies à forme cutanée limitée (95 des syndromes CREST) et dans 8 % des sclérodermies systémiques diffuses, ainsi qu'au cours des cirrhoses biliaires primitives (CBP) et du SGS secondaire[8].

### II.6.4 Les anticorps anti membrane nucléaire :

Les anti-gp210 sont retrouvés dans la CBP, notamment séronégative pour les anti-M2 ; anti-lamines A, B, C (sans significativité clinique)[8, 29].

### II.6.5 Les anticorps d'aspect dots nucléaires[8] :

- multiples (6-20) : anti-Sp100 et anti-PML dans la CBP ;
- quelques (1-6) : anti-coiline.

La présence d'anti-gp210 est de mauvais pronostic dans la CBP.

Connectivite	Anticorps associés
Lupus érythémateux systémique	Anti-ADNds Anti-nucléosome Anti-Sm Anti-Ro/SSA Anti-RNP
Sclérodermie	Anti-scl70
CREST	Anti-centromère
Syndrome de Sjörgen	Anti-Ro/SSA Anti-La/SSB

Tableau II-3 auto-anticorps associés aux connectivites [33]

### III. CHAPITRE : AUTO-ANTIGENES NUCLEAIRES

#### III.1 Définition

Les auto-antigènes nucléaires sont des protéines, acides nucléiques ou complexes protéine/acide nucléique, reconnus par des auto-anticorps antinucléaires[37]. De localisation nucléaire ubiquitaire, ce qui explique leur implication dans les maladies auto-immune systémiques. Ils deviennent immunogènes au cours d'une dysrégulation de l'apoptose (mort cellulaire programmée) [38]; qui met en jeu deux processus distincts mais souvent associés :

- Translocation des auto-antigènes intracellulaires cryptiques normalement invisibles au système immunitaire, à la surface de la membrane cellulaire des cellules apoptotiques où ils deviennent plus accessibles ;

- Modifications post-traductionnelles des protéines par des enzymes activées lors de l'apoptose, (phosphorylation...). Certaines de ces modifications semblent caractéristiques d'une maladie auto-immune donnée[37].

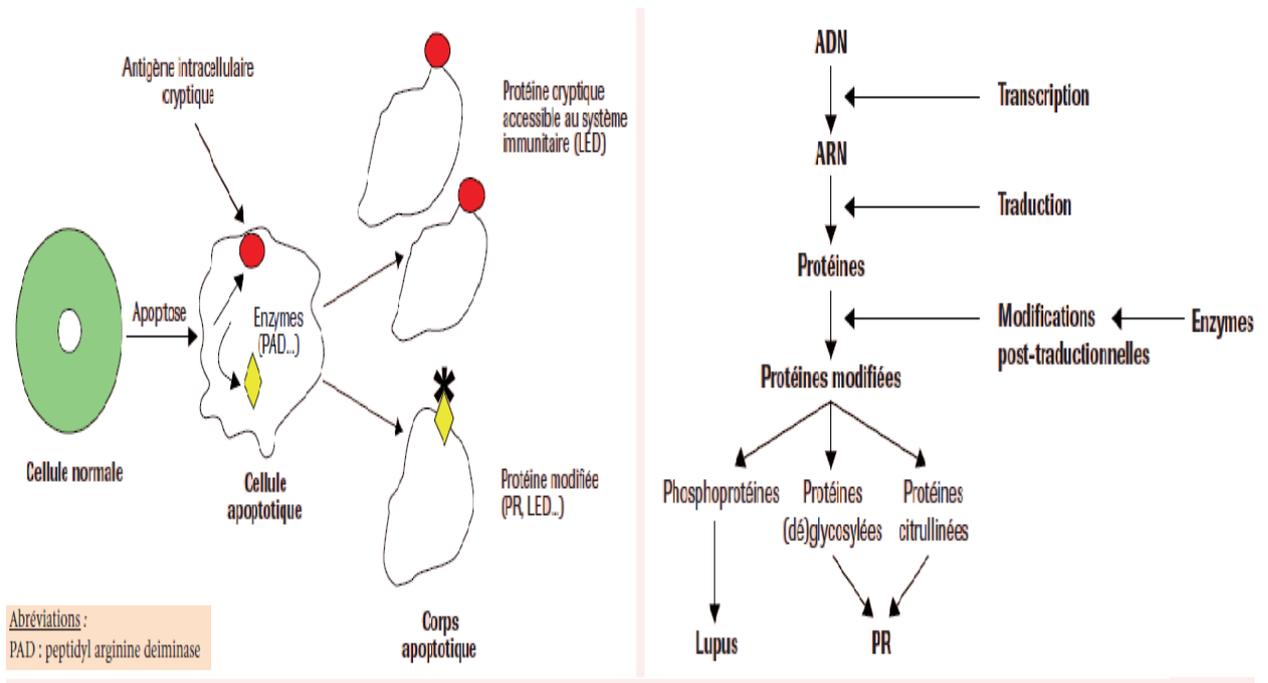


Figure III-1 Présentation au système immunitaire d'épitopes cryptiques ou de protéines modifiées lors d'un processus apoptotique (à gauche) et Modifications post-traductionnelles des protéines reconnues par certaines populations d'auto-anticorps (à droite)[37]

## III.2 CARACTÉRISATION structurale et fonctionnelle

### III.2.1 ADNdb :

C'est acide désoxyribonucléique en double hélice, bicaténaire ou natif qui est reconnu par les auto-anticorps anti-ADN natif de forte affinité possédant une valeur diagnostique par opposition aux auto-anticorps anti-ADN reconnaissant l'ADN dénaturé ou simple brin. ADN natif est le porteur de l'information génétique et il est présent dans toutes les cellules nucléées de l'organisme. Il est peu immunogène de ce fait l'émergence des anti-ADNdb reste mal comprise[39].

### III.2.2 Histones :

Les histones sont les principaux constituants protéiques des chromosomes ou elles sont étroitement associées à l'ADN, dont elles permettent la compaction, cette action forme des structures appelées nucléosomes[40]. Ils sont des petites protéines basiques de masse moléculaire comprise entre 13 et 15 kDa, très riches en acides aminés basiques (lysine et arginine), dont la charge positive à PH physiologique permet une interaction forte avec les groupements phosphates de l'ADN qui portent des charges négatives. Il existe cinq classes d'histones H1, H2A, H2B, H3 et H4[21].

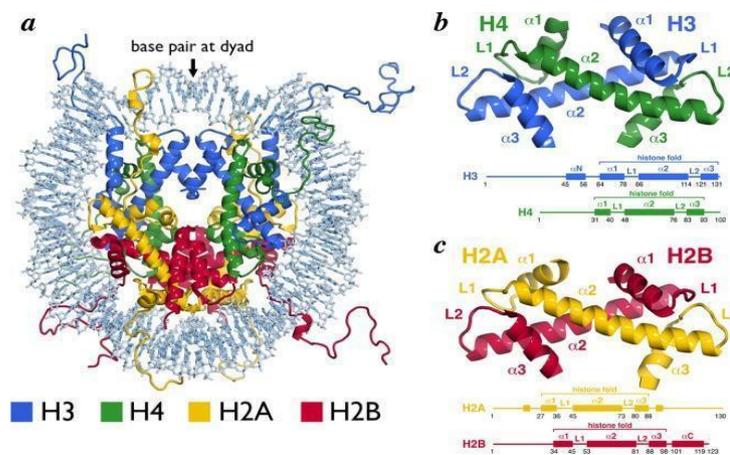


Figure III-2 Structure d'histone

### III.2.3 Nucléosome

Le nucléosome est un complexe comportant un segment d'ADN (d'environ 140 paires de bases nucléotidiques) enroulées autour de 4 paires d'histones, ce qui constitue l'unité de base de la chromatine. Leur rôle n'a été compris que récemment, il remplit trois fonctions principales[41] :

- Il s'agit du premier niveau de compactage génomique, organisant environ 200 pb d'ADN.
- Centre de signalisation pour les processus basés sur la chromatine en fournissant un support pour la liaison des enzymes de la chromatine et en affichant un ensemble combinatoire de

modifications post-traductionnelles. Cette gamme de modification post-traductionnelle régle en outre le recrutement des enzymes de la chromatine et régle à la fois la stabilité du nucléosome et le compactage de la chromatine de niveau supérieur.

-Il peut s'auto-assembler dans des structures de chromatine d'ordre supérieur, permettant ainsi un compactage supplémentaire du génome.

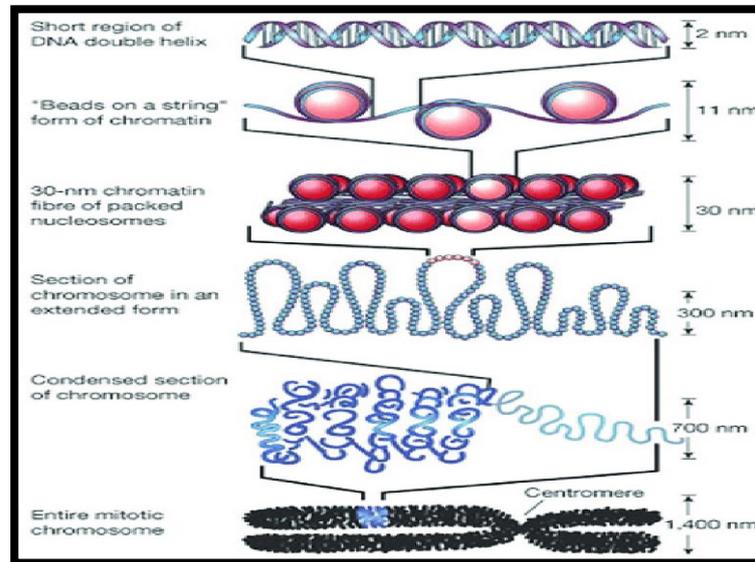


Figure III-3 rôle de nucléosome dans le compactage de l'ADN

### III.2.4 Centromère :

Un centromère représente une région étroite des chromosomes, généralement situé au centre, formé de l'ADN et protéines centromérique, et qui porte les kinétochores[42]. Les kinétochores sont de structure protéique comporte 3 zones (inner, interzone, outer), sur cette structure, des microtubules du fuseau mitotique sont ancrés au cours des processus de division cellulaire[43].

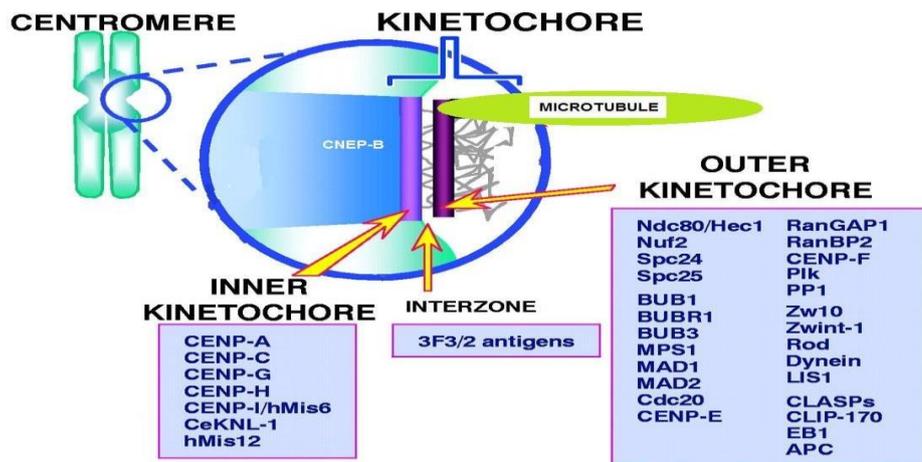


Figure III-4 structure de centromère

Les anti-centromère (ACA) reconnaissent 3 principales protéines centromériques : CENP-A, CENP-B et CENP-C, localisées dans le kinétochore, dont le poids moléculaire apparent est respectivement 17, 80, 140kDa[21].

### III.2.5 U1-snRNP et Sm :

Le snRNP (small nuclear ribonucleoproteins) est une famille de ribonucléoprotéines jouant un rôle important dans l'épissage des ARN pré-messagers. Il existe cinq grandes familles de snRNA (ou snRNP) : U1, U2, U4, U5 et U6. Ces ribonucléoprotéines peuvent s'associer à un grand nombre de peptides dont leurs poids moléculaire varie de 11 à 70 kDa nommés p70, A, A', B'', C et D[35].

D'autres peptides B (28KDa), B'(29KDa), D (16KDa), E (13 KDa) et polypeptides F et G s'associe aux snRNP formant une protéine dénommées Sm (correspond aux deux premières lettres du nom de la patiente Stéphanie Smith qui a fourni le sérum où les anticorps anti-Sm ont été décrits pour la première fois)[21]. Les anti-Sm reconnaissent surtout les sous unité B, B' et la sous unité D, cette dernière (SmD) nécessite une déméthylation symétrique des résidus d'arginine sur sa région C-terminale, cette étape est indispensable pour permettre sa réactivité avec les anticorps anti-Sm.

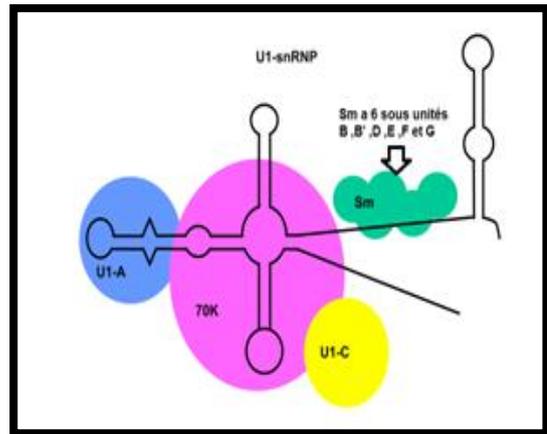


Figure III-5 Structure de U1-snRNP/Sm

### III.2.6 Ro/SSA et La/SSB

« SS » correspond à « syndrome sec » ou « syndrome de Sjögren », pathologie à laquelle les anticorps anti SS-A et -B sont fréquemment associés. Les SSA, SSB sont aussi parfois désignés respectivement par les termes de « Ro », « La » qui correspond aux deux premières lettres du nom de premiers patients chez qui les anticorps ont été décrits[44].

Le complexe Ro/SSA – La/SSB se compose de trois protéines différentes (Ro/SSA de 52 kDa, Ro/SSA de 60 kDa et La/SSB phosphoprotéine de 48

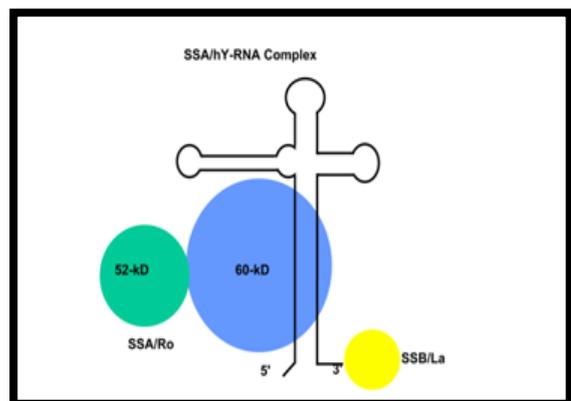


Figure III-6 Structure de Ro/SSA , La/SSB

kDa) et de quatre petits ARN connus sous le nom d'ARN Y. Les humains ont quatre types d'ARN Y : hY1, hY3, hY4 et hY5[45].

La fonction de la particule Ro/SSA n'est pas bien comprise. Des preuves récentes suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans le contrôle de la qualité des petits ARN mal repliés et dans la prévention des dommages cellulaires induits par la lumière ultraviolette. Concernant la particule La/SSB, selon les derniers recherche, elle est probablement un facteur de terminaison de la transcription de l'ARN polymérase III[21, 46].

### III.2.7 PCNA

Le PCNA est une protéine constituée de trois sous-unités formant un anneau (figure III-7). Cette structure lui permet d'encercler le brin d'ADN et de coulisser le long de ce brin[47]. Il est abondant dans les noyaux des cellules proliférantes ce qui explique que les auto-anticorps anti-PCNA lui donnent un schéma nucléaire polymorphe dans les cellules d'immunofluorescence indirecte HEp-2, correspondant à différentes phases du cycle cellulaire, car il s'associe à différents sites du noyau cellulaire où l'ADN est répliqué. Le PCNA est impliqué dans les processus de réplication, de réparation et de recombinaison de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire[21].

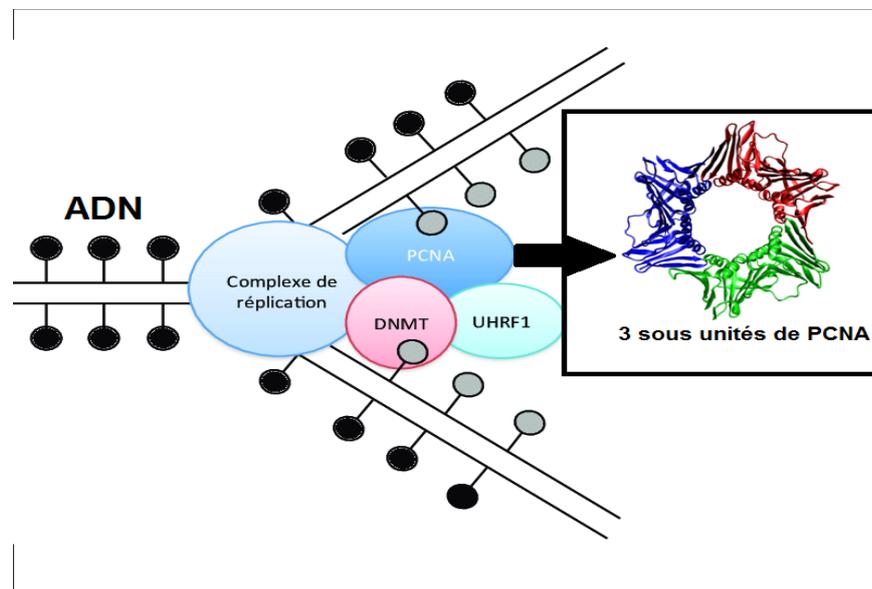


Figure III-7 structure d'Antigène nucléaire des cellules en prolifération PCNA

Les recherches montrent un nouveau rôle de PCNA, dans le neutrophile mature, qui est une cellule qui ne prolifère pas, PCNA est uniquement cytoplasmique. Lorsque le neutrophile survit, PCNA cytoplasmique s'associe avec des protéases impliquées dans l'apoptose et bloque leur activation. Lorsque le neutrophile reçoit des signaux de mort, de façon physiologique ou en présence d'un peptide provenant de la protéine P21/waf1, qui se lie spécifiquement à PCNA, le PCNA est dégradé et le neutrophile sera apoptosée[48].

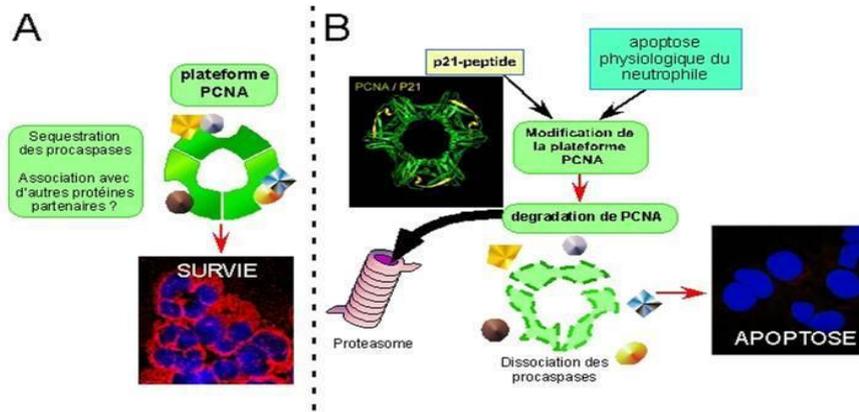


Figure III-8 Mécanisme de rôle de PCNA dans les neutrophiles[48]

### III.2.8 Sc1-70

Le signe Sc1-70 vient du fait que les anticorps anti-Sc170 ont été mis en évidence initialement dans le sérum de patients atteints de sclérodémie, et du poids moléculaire apparent de l'antigène reconnu (70 KDa). Cet antigène a été identifié comme étant l'ADN topoisomérase I[44].

L'ADN topoisomérase I est une enzyme nucléaire ubiquitaire dont la fonction principale est d'assurer le bon déroulement de la condensation et de la décondensation des chromosomes au cours de la division cellulaire. Elle permet la relaxation de la structure hélicoïdale de l'ADN pendant sa transcription et sa duplication (figure III-9)[21, 49].

La cible antigénique des Ac anti-Sc170 correspond à l'ADN topoisomérase qui, sous sa forme native a un poids moléculaire de 100 kDa avec un produit de dégradation de 70 kDa qui est l'épitope majeur[21].

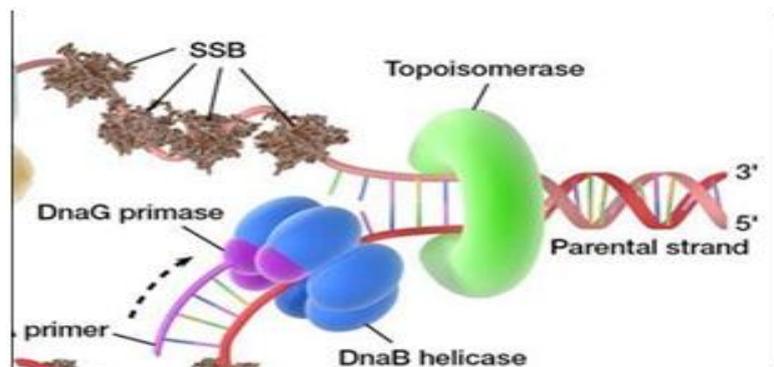


Figure III-9 Rôle de ADN topoisomérase I

**-Récapitulation-**

	<b>Caractérisation</b>	<b>Fonction biologique</b>
<b>dsADN</b>	ADN double brin (natif)	Porteur du code génétique
<b>Histones</b>	H1, H2A, H2B, H3, H4, H5, [H2A-H2B]-DNA dimer	Organisation des nucléosomes
<b>Sm</b>	Protéines smB (28KD), smB(29KD), smD (16KD), smE (13 KD), smF et smG des snRNP U1,U2, U4, U5, et U6	Epissage du pré-ARNm
<b>Nucléosome</b>	140 paires de nucléotides enroulées autour d'un cœur comportant 4 paires de molécules d'histones	Organisation de l'ADN nucléaire
<b>U1 snRNP</b>	Protéines 70KDa, protéine A(33KD) et protéine C(22KD) des U1 snRNP	Epissage du pré-ARNm
<b>Ro /SSA</b>	Ribonucléoprotéines de 52KD et 60KD comportants les ARNsn riche en uridine (hY1, hY3, hY4, hY5)	Ro52 KDa est protéine de liaison avec ADN ; la Ro60KDa a un rôle dans le contrôle qualité de la production de la sous unité 5s du ARNr et aussi impliquée dans la traduction du ARNm
<b>La /SSB</b>	Phosphoprotéine (48 kDa) associée à une grande variété des petits ARNs (précurseurs de l'ARNt, ARN 5s, ARN 7S, ARN viral)	Probablement facteur de terminaison de transcription de l'ARN-polymérase III
<b>PCNA</b>	Cycline 36KDa	Protéine auxiliaire de l'ADN polymérase
<b>Scl-70</b>	Topoisomérase I de structure protéique (70kDa)	Elle permet la relaxation et condensation de l'ADN pendant sa transcription et sa duplication

Tableau III-1 tableau récapitulatif des auto-antigènes nucléaires avec leurs structures et fonctions biologiques [21, 50]

### **III.3 Caractéristiques des auto-épitopes des auto-antigènes nucléaires reconnus par les AAN au cours des MAI systémiques[51]**

Les déterminants antigéniques réagissant avec les auto-anticorps antinucléaires émergents au cours des MAI systémiques sont des régions uniques de l'antigène nucléaire avec un certain nombre de caractéristiques.

Les auto-épitopes ont premièrement, la caractéristique d'être conservés chez plusieurs espèces animales. Cela est démontré en comparant la réactivité des auto-anticorps anti-SSB isolés à partir des sérums des malades atteints du syndrome Sjögren avec celle des anticorps anti-SSB monoclonaux murins expérimentalement induits envers des noyaux de cellules humaines, cellules de lapin, de rat, de bovin et de singe. Les anti-SSB isolés des sérums de

patients avaient une réactivité avec l'antigène nucléaire appartenant à toutes les espèces testées contrairement aux anti-SSB expérimentalement induits qui ont réagi seulement avec l'antigène qui a initialement été utilisé pour l'induction de leur production. On en déduit que les deux anti-SSB ne reconnaissent pas le même épitope de l'antigène SSB et que celui reconnu par les anti-SSB de la maladie de Sjögren est conservé chez toutes les espèces testées.

Par ailleurs, des études montrent que les auto-anticorps antinucléaires spécifiques d'un antigène nucléaire fonctionnel ont la capacité d'inhiber son activité fonctionnelle. C'est le cas des anticorps anti-RNP comme les anti-Sm et les anti U1-snRNP, qui sont capable d'inhiber l'épissage du pré-ARNm. De ce fait on admet que les auto-épitopes correspondants aux AAN ont une position proche du site fonctionnel de l'auto-antigène.

De plus, l'analyse de la structure moléculaire des auto-épitopes impliqués dans la réaction auto-immune a montré que ces derniers sont des séquences conformationnels discontinues de l'antigène. Ce dernier point explique une des difficultés rencontrées pour reproduire la réaction antigène/anticorps in vitro au cours des techniques de recherche des AAN (utilisant des antigènes synthétiques ou recombinants) avec une spécificité comparable à celle de la réaction ayant lieu in vivo. Car les épitopes conformationnels sont moins stables et peuvent disparaître par dénaturation, alors que la structure des épitopes linéaires n'est pas détruite par la dénaturation de la protéine.

### III.4 Importance des Antigènes dans la méthode de recherche des auto-anticorps[52] :

La recherche des autoanticorps par les différentes techniques utilisées repose sur le principe de la reconnaissance spécifique entre l'anticorps et l'antigène correspondant. Un des problèmes majeurs rencontrés dans le développement de ces tests est le choix de l'antigène et la façon de l'utiliser. C'est de ce choix que va dépendre la sensibilité et la spécificité du test choisi.

La spécificité dépend d'abord de la pureté de l'antigène, de sa stabilité et de son immunoréactivité. L'immuno-réactivité, c'est-à-dire la façon avec laquelle l'antigène réagira avec l'auto-anticorps correspondant, dépend également de la façon dont cet antigène est présenté dans le test. La grande

majorité des auto-antigènes sont des protéines présentes dans les cellules sous forme de

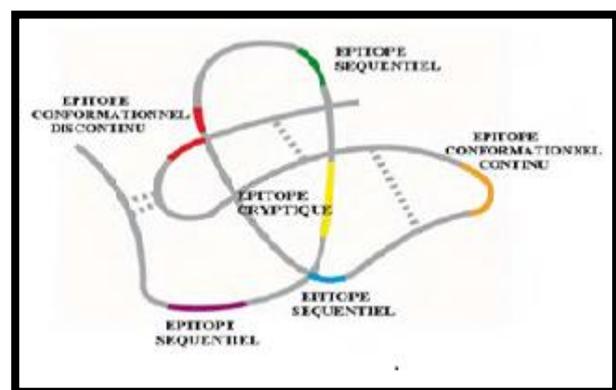


Figure III-10 Distribution des épitopes sur l'antigène

complexes macromoléculaires protéine-protéine, ou associés à des acides nucléiques : les complexes nucléoprotéiques (nucléosome, ribonucléoprotéines), sur lesquels se trouvent des épitopes particuliers. Les acides nucléiques, ADN et ARN, peuvent également se comporter comme des auto-antigènes. L'antigène peut comporter plusieurs épitopes séquentiels, conformationnels, continus ou discontinus (figure III-10).

Les préparations antigéniques utilisées dans les différentes techniques sont soit des extraits bruts ou purifiés de tissus animaux ou humains (antigènes naturels ou natifs), soit des antigènes obtenus par génie génétique (antigènes recombinants). Des peptides synthétiques correspondant à la séquence d'acides aminés qui porte les épitopes majeurs pour certains auto-anticorps sont également utilisés.

### **III.4.1 Types d'antigènes utilisés dans les techniques de recherche des AAN :**

#### **III.4.1.1 Les antigènes naturels (natifs)**

Ce type d'antigène est utilisé dans la technique d'immunofluorescence indirecte. Le substrat antigénique est constitué de coupes de tissus ou de cellules en culture. Les antigènes cibles sont présents dans leur conformation native et leur environnement naturel, c'est-à-dire sous forme de complexes. La nature du substrat est un paramètre important. Pour la recherche des auto-anticorps non spécifiques d'organes, on utilise généralement les cellules HEP-2 qui constituent le substrat universel pour la recherche des AAN.

#### **III.4.1.2 Les extraits antigéniques**

Le Western blot Ou immunotransfert, il utilise un extrait antigénique préparé à partir d'un organe ou de cellules isolées ou en culture. Les agents de solubilisation contiennent des détergents (SDS) et des agents réducteurs (mercaptoéthanol) qui ont pour effet de dissocier les liaisons disulfures et de rompre la configuration tridimensionnelle des protéines dans le but de les linéariser. Ce traitement permet de séparer les protéines dans le gel d'électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire. La technique du Western blot ne permet donc pas de détecter les auto-anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels.

#### **III.4.1.3 Les antigènes purifiés**

Les divers immunodosages font appel à des antigènes purifiés, bien que la tendance évolue de plus en plus vers l'utilisation des antigènes recombinants. Toutefois, dans bien des situations, il est encore nécessaire d'avoir recours aux antigènes naturels purifiés, en particulier

lorsque les auto-anticorps reconnaissent principalement des épitopes conformationnels. La qualité des antigènes ainsi obtenus dépend de la nature des tissus employés. Les procédés d'extraction peuvent entraîner des dénaturations des protéines par les agents détergents, la température, l'action des protéases. L'immuno-purification est dépendante de la qualité et de la spécificité des anticorps couplés à la colonne de chromatographie. L'élution des protéines à partir des colonnes nécessite également l'utilisation de tampon fortement hypermolaire ou composé d'agents très agressifs comme le chlorure de guanidine.

#### **III.4.1.4 Les antigènes recombinants**

Les antigènes recombinants sont utilisés dans les techniques d'auto-immunité depuis les années 80. Différents systèmes d'expression ont été développés pour produire les protéines recombinantes en grandes quantités, à l'état de grande pureté et de façon reproductible. Le premier système utilise la fabrication des recombinants par la souche bactérienne *Escherichia coli* dont la culture est facile et d'un coût faible. Ce système a toutefois ses limites. Chez les procaryotes, transcription et traduction sont simultanées et il n'y a pas de modifications post-traductionnelles (glycosylation, acétylation, phosphorylation). Il y a peu de modifications des protéines après leur synthèse, en particulier elles n'acquièrent pas de conformation tridimensionnelle. De plus, elles s'agglomèrent dans des inclusions d'où il faut les extraire par des procédés chimiques agressifs. L'expression dans des cellules eucaryotes a été introduite il y a quelques années avec l'utilisation de cellules d'insecte (cellules SF9 provenant du papillon *Spodoptera frugiperda*) et, comme vecteur, d'un ADN viral, le baculovirus, non pathogène pour les vertébrés. Chez les eucaryotes, transcription et traduction ont lieu dans deux compartiments différents, le noyau et le cytoplasme. La protéine traduite se replie correctement grâce à la formation de ponts disulfures, à une glycosylation et à l'aide de protéines spécialisées, les foldases. Toutefois, dans certains cas, la protéine recombinante ne correspond pas exactement à la protéine native. Des tentatives de production de certaines protéines recombinantes par des cellules de mammifères (rein ou ovaire de hamster, ou cellules humaines de rein) ont également été entreprises. Dans ces cellules, la maturation des protéines est proche de celle des protéines natives. Mais la culture est lente, difficile, coûteuse et le rendement est faible. Les modifications post-traductionnelles des protéines jouent un rôle essentiel pour certains autoantigènes. La diméthylation symétrique des résidus d'arginine sur la région C-terminale des protéines SmD est indispensable pour permettre leur réactivité avec les anticorps anti-Sm.

<b>Antigènes nucléaires</b>	<b>Protéines recombinantes</b>	
<b>RNP</b>	Protéine RNP 68/70 kDa RNP A RNP C	32kDa 18kDa
<b>Sm</b>	Protéine Sm D SmB,B'	16kDa 28,29kDa
<b>Ro/SS-A</b>	Protéine 60 kDa	
<b>La/SS-B</b>	Protéine 48 kDa	
<b>Scl-70</b>	Protéine 91 kDa	
<b>Centromère</b>	Protéine CNEP-A Protéine CNEP-B	17kDa 66kDa
<b>Ku</b>	Protéine 70kDa 80kDa	
<b>Mi2β</b>	Protéine 221kDa	
<b>PCNA</b>	Protéine 29kDa	
<b>PM-Scl</b>	Protéine 100kDa 75kDa	
<b>Sp 100</b>	Protéine 100kDa	

Tableau III-2 Antigènes recombinants disponibles pour la recherche des autoanticorps antinucléaires.

#### **III.4.1.5 Les peptides synthétiques**

Une fois la structure fine des protéines antigéniques établie et la séquence des acides aminés correspondant aux régions épitopiques précisée, des peptides synthétiques ont pu être produits. Plusieurs d'entre eux sont utilisés dans les immunodosages pour la recherche des auto-anticorps.

### **III.4.2 Méthodes d'utilisation des antigènes dans les techniques de recherche des AAN**

Les méthodes de recherche et d'identification des autoanticorps sont toutes basées sur l'utilisation d'un antigène spécifique, naturel ou recombinant, présenté aux anticorps dans un environnement approprié. On distingue deux types de méthodes, celles dans lesquelles la réaction se déroule avec un antigène en phase liquide, et celles qui utilisent un antigène immobilisé.

#### **III.4.2.1 L'utilisation d'un antigène en phase liquide**

Elle permet la réaction avec les épitopes conformationnels et linéaires. Dans les techniques radio-immunologiques, les antigènes sont marqués par un radioélément. Le complexe antigène-

anticorps est séparé par relargage par le sulfate d'ammonium ou par précipitation avec une antiglobuline humaine. Une adaptation de ce principe à l'ELISA consiste à utiliser un antigène marqué par la biotine et à capturer le complexe de cet antigène avec l'anticorps sur des microplaques recouvertes d'avidine qui fixe la biotine. Ce procédé permet de mesurer les anticorps qui ne reconnaissent que des épitopes conformationnels.

#### **III.4.2.2 Les méthodes utilisant un antigène immobilisé sur une surface solide**

Ce sont les plus utilisées. Elles concernent aussi bien l'ELISA et l'immunodot que les techniques plus récentes faisant appel à la chimiluminescence, à la fluorimétrie et les biopuces (biochips). Dans ces techniques, l'étape importante est l'immobilisation de l'antigène en quantité suffisante et son orientation pour assurer une immunoréactivité maximale avec les anticorps. L'immobilisation des antigènes sur une surface solide peut se faire de diverses façons (figure 11). La plupart des techniques ELISA utilisent des plaques de polystyrène recouverte de l'antigène. La fixation sur ce support solide a lieu via des interactions hydrophobes. Elle conditionne la quantité d'antigène adsorbée ainsi que l'orientation de la molécule et sa stabilité. Cette fixation est aléatoire et elle peut induire des modifications conformationnelles des biomolécules se traduisant par une perte des épitopes liés à cette configuration.

L'immobilisation assistée des antigènes consiste à favoriser l'adsorption à l'aide de ligands chimiques ou grâce à des anticorps monoclonaux. Le prétraitement des plaques de polystyrène par l'orangé d'acridine ou le bromure d'éthidium favorise la liaison de l'ADN.

L'immunocapture consiste à immobiliser sur la plaque un anticorps monoclonal spécifique pour l'antigène que l'on désire fixer, mais ce monoclonal doit reconnaître un épitope différent de celui qui est reconnu par les autoanticorps. Une autre stratégie, plus performante, implique l'immobilisation orientée des protéines par couplage covalent. Il s'agit dans ce cas d'une liaison chimique entre la protéine et le support. Le couplage covalent est indispensable pour la fixation des peptides sur un support solide.

L'immunodot utilise le principe de l'immobilisation de l'antigène sur une membrane de nitrocellulose. Grâce à sa surface poreuse, la nitrocellulose est capable de retenir un plus grand nombre de molécules protéiques que le polystyrène. Les interactions hydrophobes sont responsables de l'immobilisation des protéines, mais d'autres forces semblent impliquées dans leur arrimage. De nouvelles techniques basées sur la chimiluminescence ou le principe Luminex® utilisent des microbilles fluorescentes recouvertes des antigènes. Ces derniers sont

liés aux microbilles par des interactions covalentes. La dispersion de ces microbilles dans le milieu réactionnel permet une plus grande surface d'interaction de l'antigène et de l'anticorps ce qui accroît la sensibilité du test.

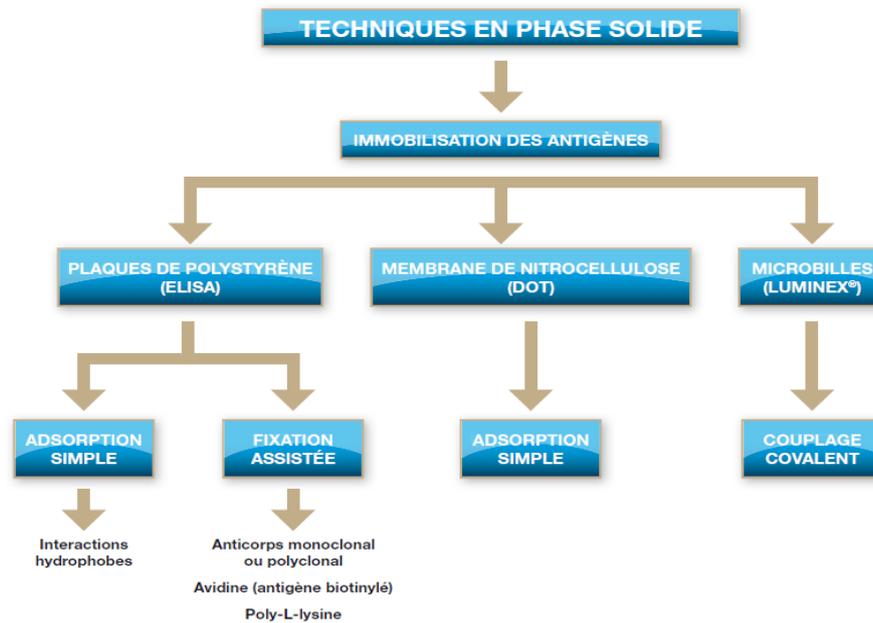


Figure III-11 Principaux procédés d'immobilisation des antigènes dans les techniques en phase solide.

## IV. CHAPITRE : RECHERCHE DES AAN

### IV.1 Indications de la recherche des auto-anticorps antinucléaires :

Leur recherche est indiquée :

- en cas de suspicion de MAI systémique (un lupus érythémateux systémique, un syndrome de Sjögren, une atteinte musculaire inflammatoire, une sclérodermie, une connectivite mixte) ou hépatite auto-immune
- au cours du suivi de certaines MAI (LES)
- dans d'autres situations cliniques : lupus néonatal

Elle se fait soit en une étape, consistant en la recherche et l'identification directe de la spécificité anticorps, soit en deux étapes, avec un test de dépistage par immunofluorescence indirecte (IFI), puis une technique d'identification des cibles antigéniques[3].

### IV.2 Techniques de recherche des auto-anticorps antinucléaires

#### IV.2.1 Technique radioimmunologique[53]

##### IV.2.1.1 HISTORIQUE

Les méthodes radio-immunologiques ont été utilisées dès 1959 pour des dosages hormonaux (Yalow et Berson, 1959, pour l'insuline). Leur grande sensibilité permettant la quantification de substances présentes à de très faibles concentrations, leur utilisation s'est ensuite étendue à d'autres domaines de la biologie médicale et notamment en immunologie pour l'exploration de l'allergie (on parle de RAST, Radio Allergo Sorbent Tests) et la quantification des auto-anticorps. L'expansion des radio-immunodosages a suivi une courbe exponentielle jusqu'à l'années 1980, quand l'apparition des traceurs froids a révolutionné l'approche méthodologique des immunodosages, et relégué la RIA à quelques cas d'espèces, en voie de disparition. En parallèle une méthode immunoenzymatique originale a toutefois été récemment développée et donne une qualité de résultats plus fiable, la radio-immunologie est devenue le parent pauvre des immunodosages.

Actuellement la radio-immunologie n'est plus utilisée qu'à l'exception dans la confirmation de la présence des auto-anticorps antiADNdb (test de Farr), et dans l'hormonologie[54].

### IV.2.1.2 PRINCIPE

La RIA classique repose sur le principe d'une liaison compétitive entre un antigène donné préalablement marqué par un radioisotope (iode\* généralement) et l'antigène de l'échantillon issu du patient pour la même quantité d'anticorps spécifique fixé sur un support solide.

On mesure la fraction des antigènes du prélèvement du patient qui déplace les antigènes marqués par le radioisotope des sites d'anticorps, ça se traduit par une diminution exponentielle de l'activité radiologique proportionnelle à la concentration l'antigène recherché.

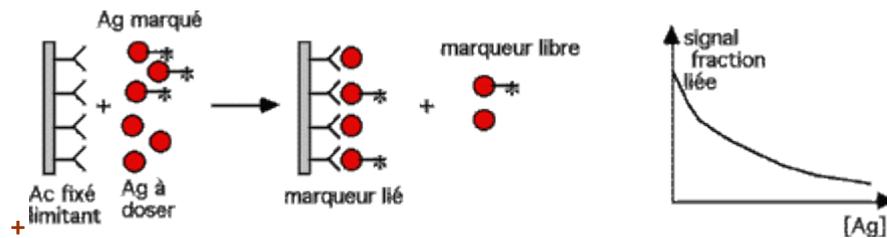


Figure IV-1 principe de la technique radio-immunologique [55]

### IV.2.1.3 AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
Simplicité du marquage.	Toxicité
Pas de modification du comportement de la molécule tracée.	Environnement
Grande spécificité du signal.	Péremption rapide (radiolyse, décroissance)
Grande sensibilité de la détection.	Législation
Précision de la mesure.	Coût
	Pas d'automatisation.
	Blanc échantillon parfois difficile à réaliser.

Tableau IV-1 Avantages et inconvénients de la technique Radioimmunologique[54]

## IV.2.2 Technique immunodot Dot-Blot[54]

### IV.2.2.1 HISTORIQUE

La technique de l'immunodot pour la recherche des anticorps a été introduite en 1982 par Paul Herbrinck et col, sous l'appellation de « Antigen Spot Test » ou AST. Les auteurs se sont inspirés de la technique du Western blot, ou immunotransfert, développée par Towbin en 1979. Mais, contrairement à cette dernière, les protéines ne sont pas transférées d'un gel d'acrylamide

sur une membrane de nitrocellulose, mais sont directement appliquées sur des bandelettes sous forme de spots pour former des « dots ». Le terme de dot-blot quelquefois employé est donc tout à fait impropre puisque le procédé ne comporte aucune opération de transfert, c'est-à-dire de « blotting ».

La première dot pour la détection d'auto-anticorps a été présentée en 1990, utilisant des protéines recombinées RNP, Sm, SS-A et SS-B, ainsi que de l'ADN de thymus de veau. Depuis, de nombreux immunodots ont été commercialisés pour la recherche des anticorps antinucléaires et des auto-anticorps spécifiques d'organes.

#### IV.2.2.2 PRINCIPE

Le dépôt des antigènes peut sous forme d'une petite tache ronde (dot-spot) ou en ligne fine (dot-line) sur un support en nylon ou du dérivé cellulosique pour assurer une bonne capacité d'adsorption et une meilleure affinité pour les antigènes ceci réduit le risque de dénaturation des antigènes. Plusieurs antigènes différents peuvent être déposés sur la même membrane

permettant la détection simultanée de nombreux anticorps différents. Une fois séchée, la membrane est saturée par des agents bloquants et stabilisants puis conservée à l'abri de l'humidité. Ces antigènes alors situés à la surface de la membrane peuvent se complexer avec leurs anticorps spécifiques par incubation avec le sérum. Les anticorps capturés sont localisés par immunodétection, à l'aide d'un antisérum marqué

par une enzyme, et révélés par le substrat correspondant. La lecture des résultats par simple appréciation visuelle de la coloration fournit des résultats qualitatifs, à la limite semi-quantitatifs si l'on tient compte de l'intensité de la coloration.

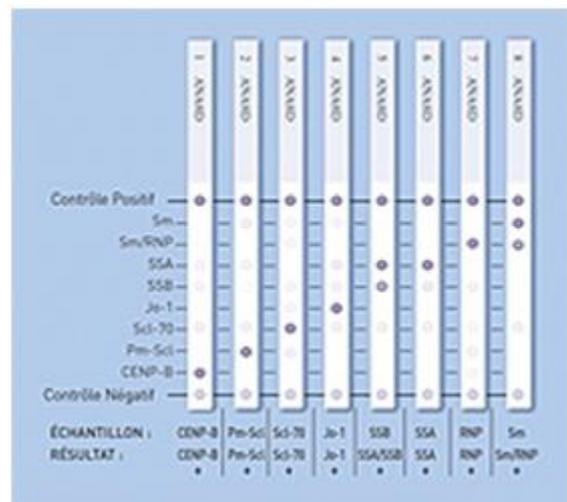


Figure IV-2 Principe de l'immunodot

**IV.2.2.3 AVANTAGES ET INCONVENIENTS[53]**

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Analyse de complexes protéiques, de plusieurs protéines simultanément, des modifications post-traductionnelles des protéines	Conditions optimales d'émigration et de transfert à déterminer pour chaque type de protéines à analyser
Large application analytique dépendant du vaste choix d'anticorps spécifiques	Risque de réactivité non spécifique des anticorps secondaires en technique de révélation indirecte
Mesure quantitative possible	Durée technique beaucoup plus longue qu'un ELISA et moins standardisable

Tableau IV-2 Avantages et inconvénients d'immunodot

**IV.2.2.4 APPLICATION**

Actuellement l'immunodot est de plus en plus utilisés dans les laboratoires. Ils prennent tout leur intérêt pour les analyses au coup par coup : soit pour confirmer un aspect de fluorescence, soit pour répondre à une demande urgente, ou plus généralement, pour répondre à des demandes de recherches d'auto-anticorps trop peu nombreuses pour justifier l'utilisation de techniques comme l'ELISA qui sont mieux adaptées aux analyses en série.

**IV.2.3 Technique immunofluorescence indirecte IFI [9]**

L'immunofluorescence indirecte (IFI) représente la technique maîtresse de dépistage des autoanticorps puisqu'elle permet la détection de la plupart des anticorps (Ac) utiles au diagnostic, pronostic et suivi des maladies auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organe.

**IV.2.3.1 HISTORIQUE**

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. En 1942, grâce à des anticorps marqués à la fluorescéine par ses amis chimistes, il réussit à mettre en évidence des antigènes pneumococciques dans les lésions de rhumatisme articulaire aigu. Ce tour de force marque le début de sa gloire.

L'année 1957 marque la naissance de dépistage des anticorps antinucléaires par immunofluorescence. 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. George Friou, chef du service des maladies infectieuses de l'hôpital de West Haven montre que le sérum des lupiques se fixe sur le noyau des cellules[56]. La même année, Anderson décrit les anticorps anti-surrénales, puis en 1961 Beck décrit les premiers aspects de fluorescence des

anticorps antinucléaires[57] , 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 autoanticorps ont été découverts : anticorps anti-LKM (Rizzetto, 1973), îlots de Langerhans (Bottazzo, 1974), ANCA (Davies, 1982 et Van der Woude, 1985), cytosol hépatique (Martini, 1989), ASCA (1998)...[28]

#### IV.2.3.2 PRINCIPE

L'IFI utilise les propriétés de la réaction antigène/anticorps. Un anticorps 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 (auto-antigène en ce cas).

L'IFI s'effectue en deux temps : le complexe antigène-anticorps est révélé par un anticorps marqué spécifique de l'isotype du premier anticorps. Lors d'une première incubation, le sérum du patient, source potentielle des autoanticorps, 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. Les fluorochromes sont des substances qui ont pour propriétés d'émettre une fluorescence dans le visible lorsqu'ils sont excités par une lumière dans les longueurs d'onde de l'ultraviolet. Trois sont d'utilisation courante : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et la rhodamine. La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé en épillumination[58].

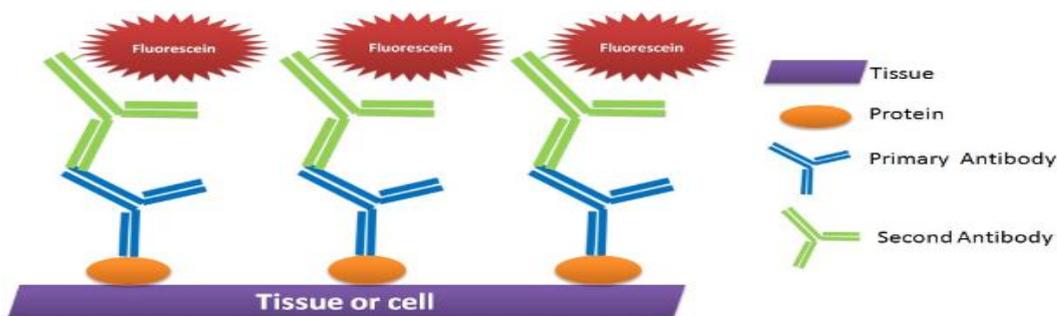


Figure IV-3 Figure IV-4 : principe de technique immunofluorescence indirecte

### IV.2.3.3 FACTEURS INFLUENÇANT L'IFI

- Paramètres liés au substrat

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

C'est une tautologie que d'affirmer qu'il doit contenir l'auto-antigène, dans sa bonne conformation épitopique. C'est l'avantage de l'IFI sur les tests en phase solide (ELISA, immunodot) que d'offrir les cibles, qui sont souvent des complexes macromoléculaires[59], sous leur conformation native dans leur milieu « naturel ».

Les anticorps non spécifiques d'organes peuvent être recherchés sur des tissus de rongeurs, alors que ceux spécifiques d'organes demandent des tissus de primates comme substrats. Il peut arriver que l'auto-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.

La nature du substrat est un paramètre, sa préparation en est un autre. Qu'importe que l'auto-antigène soit présent si la fixation du substrat le fait disparaître ! L'exemple typique en est l'antigène Ro/SS-A particulièrement sensible aux mélanges d'alcools utilisés pour fixer les lames de cellules HEp-2[60].

La bonne pratique est donc, pour les substrats (tissus ou cellules), de 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.

- Paramètres liés au sérum

La recherche des auto-anticorps 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, additionné éventuellement de Tween 20 et d'albumine bovine (2 %) pour diminuer la fluorescence non spécifique. La dilution de dépistage varie avec chaque autoanticorps. Une étude a ainsi montré que 13,3 % des sérums de sujets sains possédaient des anticorps antinucléaires au titre du 1/80e, classique dilution de dépistage pour ce type d'auto-anticorps antinucléaire. Concernant le titre et la pratique de dilution de dépistage, il faut garder à l'esprit la possibilité du phénomène de prozone (excès des anticorps par rapport aux antigènes) entraînant des résultats faussement négatifs : ceci est bien connu pour les anticorps anti-mitochondries.

- Paramètres liés au conjugué

Le conjugué peut être polyvalent, reconnaissant les trois isotypes principaux (IgG, IgA et IgM) ou restreint à la seule classe IgG, parce que la majorité des auto-anticorps sont de cet isotype. Avec ce deuxième type de conjugué, on risque de passer à côté des auto-anticorps monoclonaux, qui sont le plus souvent de nature IgM, et qui ne sont pas exceptionnels. Certains font appel à des conjugués à la fois anti-IgG et anti-chaînes légères qui vont révéler les IgG, mais aussi les IgA et les IgM grâce aux anti-chaînes légères.

- Paramètres liés à la lecture au microscope

La lecture se fait avec un microscope UV équipé en épi-illumination d'une lampe à vapeur de mercure et permettant un grossissement minimum de 400. La maintenance de cet outil est un facteur clef de la qualité de la lecture (réglage du faisceau lumineux, degré d'usure de la lampe). Néanmoins, la lecture reste observatrice dépendante, certains lecteurs étant plutôt lynx et d'autres plutôt taupes.

#### IV.2.3.4 Avantages et inconvénients de l'IFI[61, 62]

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Facilité d'exécution : deux incubations de 30 minutes entrecoupées de lavages, ne nécessitant que des dilutions du sérum à tester.	Investissement dans un microscope à fluorescence avec des objectifs de qualité.
Sensibilité : l'IFI est environ 100 fois plus sensible que l'immunoprécipitation.	Le caractère non automatisable pour la totalité de la méthode avec le nécessaire contrôle de qualité de chaque étape.
Possibilité de détecter plusieurs anticorps en même temps	L'expertise de lecture indispensable à une interprétation pertinente des résultats.
Maintien de l'antigène dans sa conformation native et quasi assurance de détecter les auto-anticorps dirigés contre tous les types d'épitopes, séquentiels et conformationnels.	Le biologiste doit 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.).

Tableau IV-3 Avantage et inconvénients de technique immunofluorescence indirecte

### IV.2.3.5 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

L'interprétation des résultats doit tenir compte non seulement des données microscopiques mais aussi du contexte clinique et/ou biologique qui a nécessité la prescription d'une recherche d'auto-anticorps.

- Données microscopiques

La lecture au microscope à fluorescence constitue l'étape ultime de la technique IFI. La caractérisation des anticorps présents dans le sérum des patients est basée sur plusieurs paramètres : la nature, la localisation et parfois aussi la comparaison des intensités de la fluorescence dans les tissus ou/et cellules utilisées que l'on résume sous le terme d'aspect de la fluorescence ou pattern. Elle nécessite une parfaite connaissance de la structure histologique et cytologique du substrat utilisé. Le plus souvent, d'autres techniques sont nécessaires pour identifier les anticorps détectés. C'est l'aspect de la fluorescence sur le substrat qui va orienter les examens complémentaires qui permettront de définir leur cible exacte : Ac anti-PR3 et anti-MPO en cas de fluorescence de type c-ANCA ou p-ANCA, Ac anti-ADN natif en cas de fluorescence de type anti-chromatine sur cellules HEp-2, Ac anti-ENA en cas de fluorescence mouchetée ou homogène des cellules HEp-2 avec ou sans Ac anti-nucléole..., Parfois, l'image de la fluorescence est suffisamment évocatrice pour que l'on puisse déduire la nature de l'antigène reconnu sans autres investigations : Ac anti-centromère, ASCA, Ac anti-îlot de Langerhans, ...

Les différences intra-laboratoires peuvent être minimisées par la lecture des lames par deux personnes différentes, l'introduction de contrôles positifs et négatifs dans chaque série.

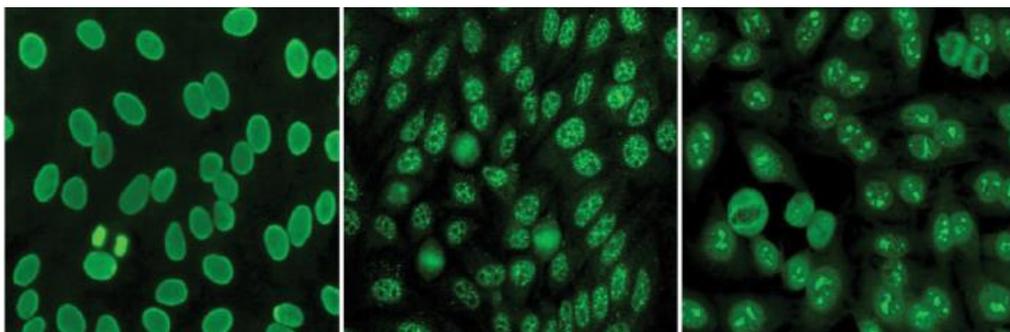


Figure IV-4 Photos de quelques aspects à grossissement x400

- Le contexte clinique

L'interprétation d'un résultat positif d'auto-anticorps doit donc tenir compte des données cliniques et des examens complémentaires : âge, sexe, antécédents personnels et familiaux, notion de prise médicamenteuse, symptômes cliniques, anomalies biologiques

(hypergammaglobulinémie, cytopénie périphérique, ...), radiologiques associées, ... Ce n'est que de la confrontation clinico-biologique que va résulter un diagnostic, voire un pronostic ou une décision thérapeutique. Ainsi, dès que le clinicien suspecte l'existence d'une maladie auto-immune, la recherche des Ac marqueurs par immunofluorescence est légitime. Dans bon nombre de cas, l'identification précise de leur cible apporte plus d'informations. Ces résultats ne seront interprétables qu'une fois intégrés dans le contexte clinique et biologique qui aura justifié leur prescription. Lorsque le clinicien relève des symptômes pouvant apparaître lors de maladies auto-immunes ou lors d'une affection non auto-immune, la recherche d'auto-anticorps par immunofluorescence est effectuée pour confirmer la réalité d'une maladie auto-immune ou pour l'éliminer. L'interprétation des données clinico-biologiques peut alors être rendue difficile par certains pièges diagnostiques :

- les Ac peuvent manquer au début de l'affection et apparaître par la suite.
- les Ac ne sont pas constants au cours d'une maladie.
- les Ac peuvent ne pas être détectés en cas de déficit immunitaire (exemple des anticorps anti-transglutaminase et anti-endomysium de classe IgA, marqueurs de la maladie coeliaque pouvant être associée à un déficit sélectif en IgA).

#### **IV.2.4 Technique immuno-enzymatique ELISA[63]**

Le nombre d'auto-anticorps identifiés a considérablement augmenté ces dernières années. Mais c'est surtout l'identification des cibles moléculaires de ces auto-anticorps qui a progressé grâce à l'immunocriblage de banques d'ADN, très récemment, grâce au développement de l'analyse protéomique. Aujourd'hui encore, l'immunofluorescence indirecte sur coupe de tissus ou culture cellulaire reste la technique de choix pour le dépistage de la plupart des auto-anticorps. Cependant, l'identification des auto-antigènes a permis le développement de techniques de seconde intention, monospécifiques, nécessitant l'emploi d'antigènes hautement purifiés telles que les techniques ELISA[64].

##### **IV.2.4.1 HISTORIQUE**

A la fin des années 60, Stratis Avrameas et GB Pierce mettent au point la technique d'immuno-enzymologie, technique d'analyse par réaction entre antigènes et anticorps et utilisant comme marqueur des enzymes. Cette technique a été développée par deux scientifiques suédois, Peter Perlmann et Eva Engvall à l'Université de Stockholm en 1971 et donne naissance à la technique ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). En 1983, la technique ELISA a été bénéficié par les antigènes recombinés.

La généralisation des techniques ELISA en microplaques s'est accompagnée de leur automatisation (modules séparés puis chaînes modulables ou automates intégrés). De ce fait, elles sont actuellement très largement utilisées pour la détection des auto-anticorps.

#### IV.2.4.2 PRINCIPE DE TECHNIQUE ELISA

Il s'agit d'un dosage dans lequel un des réactifs (l'Ag ou l'Ac) est adsorbé sur un support plastique. La révélation de la réaction Ag-Ac est possible grâce au marquage du réactif libre par une enzyme. Plusieurs modalités de dosage sont possibles. Dans sa description initiale[65], la technique ELISA était utilisée pour doser un antigène (IgG humaines) et reposait sur le principe de la compétition : l'Ag apporté par le sérum entrainé en compétition avec une quantité définie du même Ag conjugué à une enzyme pour se fixer sur une quantité limitée d'anticorps adsorbés sur le support plastique. Aujourd'hui, la plupart des techniques immunoenzymatiques en microplaques utilisent le principe du sandwich plutôt que celui de la compétition, et l'utilisation du terme ELISA a été élargie pour désigner toute technique en microplaque utilisant un conjugué enzymatique. Pour la détection d'Ac, le procédé le plus utilisé est celui de ELISA indirect.

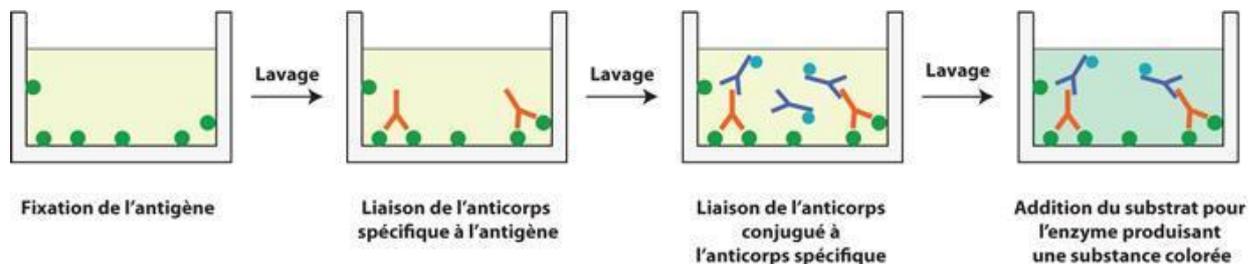


Figure IV-5 principe du test ELISA

#### IV.2.4.3 DÉTECTION D'AUTO-ANTICORPS PAR ELISA INDIRECT

Dans ce procédé, les anticorps à doser réagissent dans un premier temps avec l'Ag immobilisé. Dans un deuxième temps, la quantité d'anticorps fixés sur l'antigène en excès est mesurée à l'aide d'un deuxième anticorps conjugué à une enzyme. L'activité enzymatique, et donc la coloration du substrat chromogénique spécifique de l'enzyme est le reflet de la quantité mais aussi de l'affinité des Ac à doser.

La plupart des auto-anticorps peuvent être caractérisés par cette technique dès lors que l'antigène a été caractérisé et purifié : Ac anti-ADNs, antinucléaires solubles, antithyroïdiens, anti-MPO et anti-PR3, anti-glialine, anti-transglutaminase tissulaire...

#### IV.2.4.4 AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

- L'ELISA présente de nombreux avantages :

-C'est une technique très sensible.

-Réalisation rapide de grandes séries d'analyses.

-Technique quantitative.

-Peuvent être automatisable. Parallèlement, les automates sont devenus de plus en plus performants et ont pour avantages : une économie de temps de travail, une reproductibilité souvent meilleure qu'en technique manuelle, une gestion informatisée des résultats et des contrôles de qualité.

- Problèmes liés à l'ELISA

- Nature et qualité de l'antigènes :de nombreux Ag peuvent être utilisés, Ag natif ou dénaturé, d'origine humaine ou animale. L'utilisation de peptides synthétiques ou de protéines recombinantes peut entraîner une perte de sensibilité du test par rapport à la protéine native. L'ELISA repose sur la reconnaissance d'épitopes conformationnels ; or, une protéine recombinante peut ne pas subir de modifications post-traductionnelles intervenant dans sa structure tridimensionnelle. A fortiori, pour un peptide synthétique. Par ailleurs, l'utilisation de peptides synthétiques ou recombinants tronqués ne peut mettre en évidence que les seuls Ac dirigés contre l'épitope porté par ces peptides, et néglige les autres Ac de la réaction polyclonale. Il est donc fondamental de connaître de façon exacte la nature de l'Ag fixé sur la plaque.

-Immobilisation des antigènes : le choix du support à utiliser pour l'immobilisation des Ag est très important car il conditionne non seulement la quantité de protéines pouvant être adsorbées mais aussi la bonne orientation de la molécule et sa stabilité. Par exemple, pour détecter les Ac anti-2-GPI, on utilise des plaques de polystyrène préalablement irradié ou des plaques de chlorure de polyvinyle[66].

-Problèmes de fixation non spécifiques : la fixation non spécifique de protéines plasmatiques sur le support peut être due à une mauvaise saturation des sites libres du support. Certains constituants, agrégats d'IgG, Ig monoclonales, facteurs rhumatoïdes, peuvent conduire à des résultats faussement positifs.

-Problème de standardisation : la grande variété des Ag pouvant être fixés sur les plaques ainsi que l'extrême diversité des Ac (affinité, avidité, diversité des épitopes reconnus...) et l'absence dans la plupart des cas de sérum étalon montrent bien la difficulté de standardisation de ces techniques. De nombreuses publications comparant les performances de différentes trousse commerciales ont montré de grandes divergences de résultats[67, 68].

#### IV.2.5 Technologie Luminex®

Luminex<sup>100</sup> microsphere system® (Luminex Corporation, Austin, USA) est une technologie, qui allie les compétences de la technique de cytométrie en flux à deux lasers, et une utilisation de microsphères ou microbilles en polystyrène. Il s'agit d'un système multi-analytique puissant puisque jusqu'à 100 microbilles différentes peuvent être incluses dans un même puits de la plaque d'analyse, ce qui laisse augurer de grandes capacités d'analyses. De plus, cette technologie est susceptible d'intéresser de nombreuses disciplines biologiques, car de nombreux tests sont actuellement commercialisés ou sont en étape de recherche et développement.

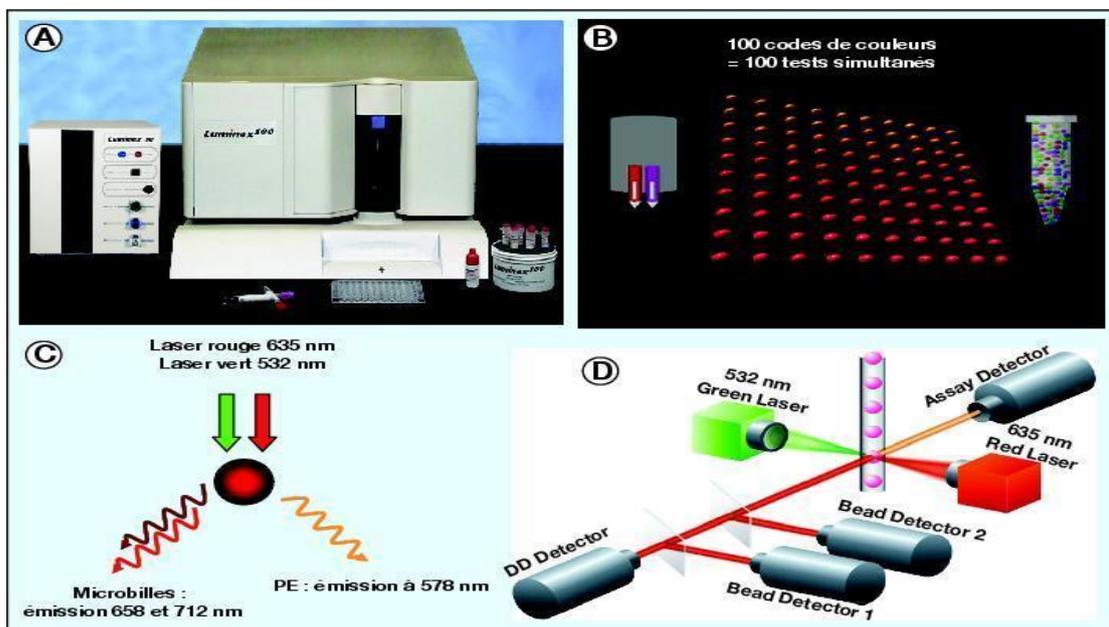


Figure IV-6 Description de Luminex

#### IV.2.5.1 PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE LUMINEX®

Il s'agit de billes de polystyrène de 5,6 µm de diamètre incorporé par deux fluorochromes préalablement lors de la fabrication. Ces derniers sont mélangés au début de l'analyse dans une plaque à 96 puits (type ELISA). Une aiguille descend dans chaque puits, aspire le mélange réactionnel dans la veine liquide. À la sortie de la veine, les billes sont excitées par un jeu de deux lasers, ayant chacun un rôle précis :

-le laser rouge à diode (633 nm), qui excite les fluorochromes incorporés aux billes de polystyrène vont réémettre une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). Chaque bille réémet d'une façon différente et sera identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge enregistrées par un capteur à la sortie du flux[69, 70].

-le laser vert, qui excite le fluorochrome qui est conjugué à une molécule reporter (Anti-immunoglobuline) permet de détecter l'interaction antigène-anticorps à la

surface de la bille en émettant une fluorescence verte (575 nm) qui détermine la positivité de la réaction en fonction d'un seuil de fluorescence propre à chaque bille[71].

Les billes sont détectées et comptées jusqu'à ce que chacune d'entre elles ait été détectée au moins 100 fois, soit au moins 10 000 événements comptés (100 × 100). Pendant cette lecture, on peut suivre en temps réel cette acquisition, par la progression du pic d'acquisition des données.

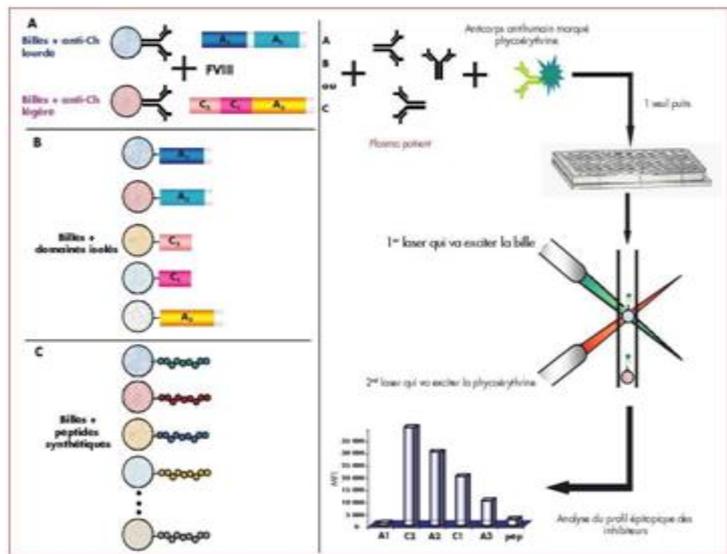


Figure IV-7 Principe de Luminex

**IV.2.5.2 AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS[53, 72]**

<b>AVANTAGES</b>	<b>INCONVÉNIENTS</b>
Détermination simultanée jusqu'à 100 analytes différents dans un seul échantillon avec un volume d'échantillon très faible.	Technique très coûteuse
Technique rapide, facile et automatisé.	Les billes présentent l'inconvénient d'être très sensibles à la lumière (leur exposition prolongée à la lumière pourrait rendre leur codage moins précis et perturber leur identification).
Quantification précise.	Problème de bouchage d'aiguille ou alors d'un problème de niveau de l'aiguille qui aspire le liquide réactionnel
Linéarité du signal mesuré jusqu'à 4 ordres de grandeur.	Les performances des lasers sont sensibles aux variations de température, et il est nécessaire de les recalibrer fréquemment.
Haute sensibilité et spécificité.	L'étape de mesure est plus longue que dans les techniques ELISA
Multidisciplinaire	Cette technologie ne permet pas de détecter séparément des anticorps d'isotypes différents dans le même mélange réactionnel

Tableau IV-4 Avantages et inconvénients de la technologie LUMINEX

PARTIE  
PRATIQUE

## Objectifs de l'étude

- **Objectif principal :**

Notre objectif principal était de définir la méthode de recherche d'AAN la plus fiable à travers une évaluation comparative de l'immunofluorescence indirecte et l'*enzyme linked immuno sorbent assay*.

- **Objectifs secondaires :**

-l'identification des spécificités antigéniques éventuellement non détectés par chacune des deux techniques de screening.

-l'étude des caractéristiques des patients envoyés pour demande d'AAN au niveau du laboratoire d'immunologie de l'unité Hassiba BENBOUALI.

-Connaitre les avantages et inconvénients des deux tests IFI sue Hep-2 et ANA-ELISA.

## V. CHAPITRE : MATERIELS ET METHODES

### V.1 Matériels :

#### V.1.1 Matériels biologiques :

##### V.1.1.1 Population étudiée :

Il s'agit d'une étude prospective comparative menée au laboratoire d'immunologie de l'unité Hassiba BENBOUALI, CHU Frantz FANON-Blida allant de la date du 10 février au 30 avril 2019. L'analyse des sérums de 348 patients était réalisée par les deux techniques ANA-ELISA et IFI sur HEp-2 et complétée par une identification conclusive, afin de comparer les 2 techniques dans le dépistage des auto-anticorps antinucléaire.

##### V.1.1.2 Critères d'inclusion :

Toutes demandes de recherche d'AAN reçues au niveau de l'unité d'immunologie Hassiba BENBOUALI, adressées par les différents services du CHU et des EPH de Blida notamment les services de rhumatologie et de médecine interne, ainsi que les patients externes, pour suspicion de connectivites, de MAI spécifique d'organe ou suivie pour connectivite, pendant la période de l'étude, était incluses dans notre étude.

##### V.1.1.3 Critères de non inclusion : Aucun.

##### V.1.1.4 Critères d'exclusion : Les patient dont les sérums étaient insuffisants ou non pas étaient trouvé

##### V.1.1.5 Échantillons :

Le sang du patient était recueilli par ponction veineuse sur tube sec et acheminé au laboratoire où il a été centrifugé à 3200 tours par minute pendant 10 min pour récupérer le sérum conservé à une température de 4C° sur lequel la détection d'AAN était faite.

##### V.1.1.6 Recueil de données :

Les données liées aux patients étaient retirées des ordonnances et des fiches de renseignement personnalisée (ANNEXE) envoyées pour demande de recherche d'AAN au niveau de notre laboratoire.

Les résultats de recherche d'AAN étaient recueillis et traités à l'aide de l'Excel.

## **V.1.2 Matériels non biologiques :**

### **V.1.2.1 Réactifs de la technique IFI :**

-Dépistage : *NOVA Lite HEp-2*.

### **V.1.2.2 Réactifs de la technique ELISA :**

-Dépistage : *QUANTA Lite ANA ELISA*

-Identification : *QUANTA Lite ENA 6 ELISA, QUANTA Lite Histone ELISA, QUANTA Lite ENA profile EIA, QUANTA Lite dsDNA SC ELISA, AESKUELISA Nucleo-h*.

### **V.1.2.3 Appareillage :**

-Microscope à fluorescence type Jenamed 2 Carl Zeiss

-Lecteur ELISA avec filtre de 450nm type MRXeDynex bioscience

-Congélateur Jouan

-Centrifugeuse Jouan type CR3i

### **V.1.2.4 Autres :**

-Tubes et consommables de prélèvement.

-micropipettes 1000, 100 et 10 et 5  $\mu$ L.

-tubes en plastiques pour la dilution des échantillons

-bocal coplin et chambres humides.

-eau distillée

-bleu d'Evans

## **V.2 Méthodes :**

### **V.2.1 Stratégie de détection d'AAN au niveau du laboratoire d'immunologie Hassiba-BENBOUALI :**

Les AAN sont détectés au niveau du laboratoire d'immunologie Hassiba benbouali en deux étapes : Dépistage puis identification. Un screening initial par ANA-ELISA est suivi en cas de positivité par un screening IFI pour orienter le test d'identification selon l'aspect de fluorescence. L'identification se fait par IFI sur *Crithidia luciliae* et par technique immunoenzymatique. Les spécificités identifiées sont les anticorps anti-dsDNA, anti-SSA, anti-SSB, anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl70, anti-Jo1 selon les étapes représentées dans le schéma (Figure V.1).

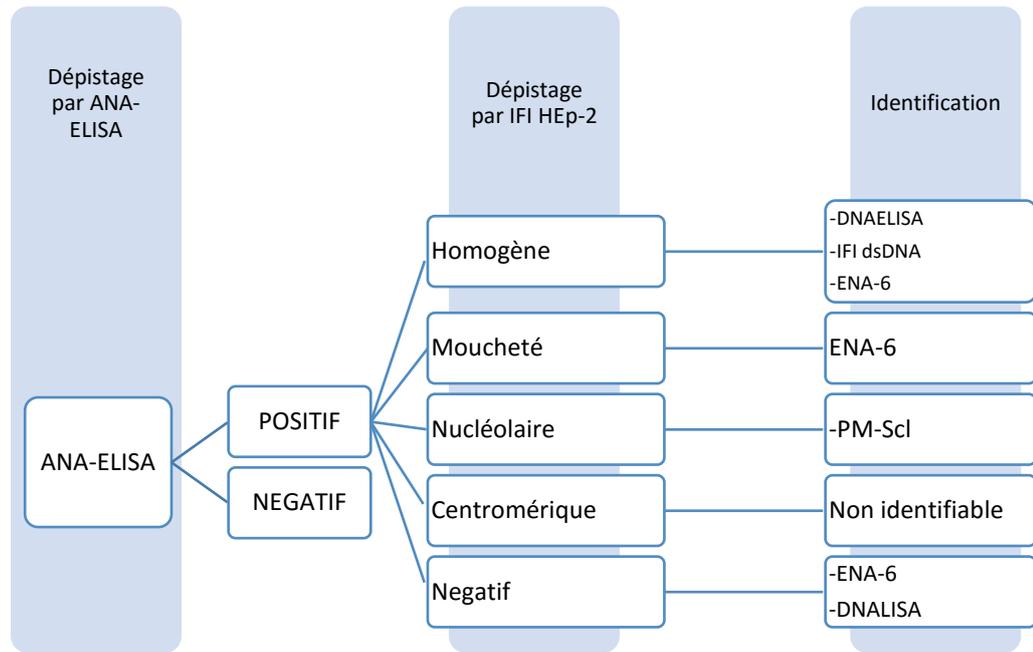


Figure V-1 Stratégie de détection d’AAN au niveau du laboratoire d’immunologie Hassiba-BENBOUALI

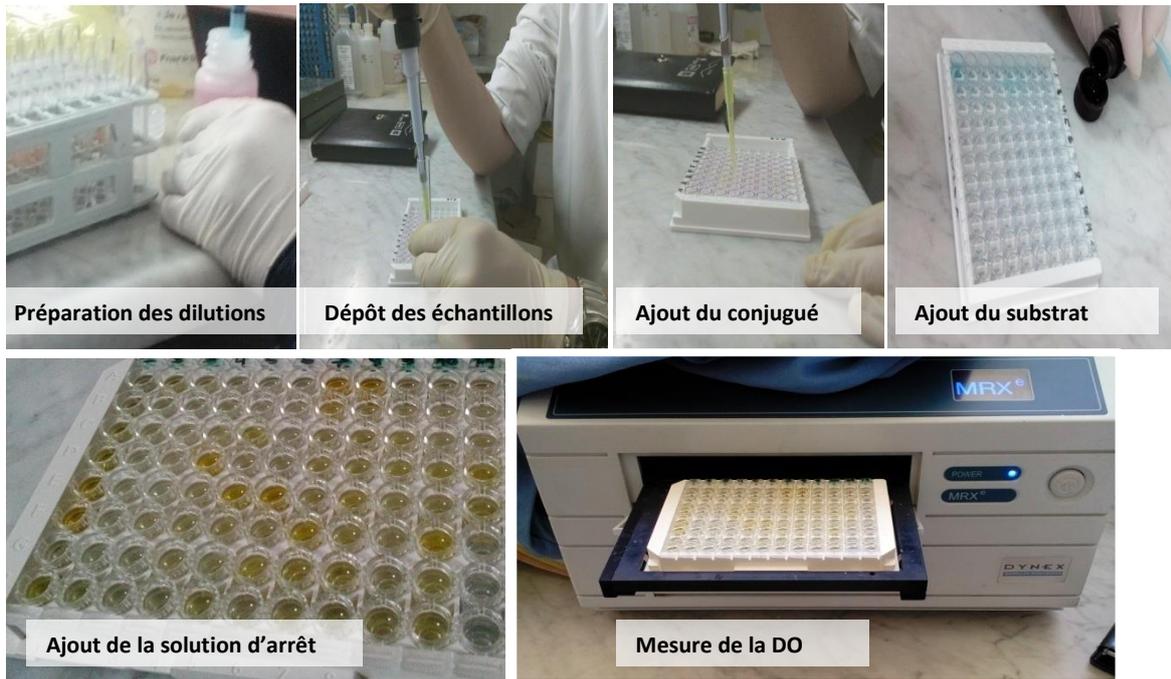
**V.2.2 Dépistage et identification d’AAN :**

	TEST	TECHNIQUE	COFFRET	SPECIFICITE RECHERCHE
Dépistage	ANA	ELISA	QUANTA Lite	Nucleosome,centromere, PCNA, Mitochondrial M2, Ribosome P, Sm, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1
	FAN	IFI sur Hep-2	NOVA Lite	Tous les AAN
Identification	ENA-6	ELISA	QUANTA Lite	Sm, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, Jo-1
	DNALISA	ELISA	QUANTA Lite	ADN double brin
	Histone	ELISA	QUANTA Lite	Histone
	Nucleo-h	ELISA	AUESKU	Nucleosome (ADN + histone)

Tableau V-1 Les différents tests réaliser dans l’étude

## V.2.3 Mode opératoire

### V.2.3.1 ELISA :



- Préparation du test
  - Tous les réactifs et échantillons étaient portés à température ambiante et bien mélangés.
  - Dilution la solution de lavage.
  - Préparation les sérums en diluant dans le diluant échantillon ANA HRP.
  - Placement le nombre nécessaire de micro puits sur le portoir.
- Exécution de test
  - Distribution des contrôles ELISA fortement, faiblement positifs en AAN et négatif pré-dilués et les sérums dilués des patients.
  - incubation 30 minutes à température ambiante.
  - Lavage : versement du contenu des puits et ajout du tampon dilué dans tous les puits qui est ensuite reversé, opération répétée 3 à 5 fois puis la plaque est retournée en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever le liquide de lavage résiduel.
  - Distribution du conjugué HS HRP IgG dans chaque puits.
  - Incubation 30 minutes à température ambiante.
  - Lavage.
  - Distribution de chromogène tétraméthylbenzidine (TMB) dans chaque puits et incubation à l'obscurité 30 minutes à température ambiante.
  - Ajout de la solution d'arrêt HRP (acide sulfurique) dans chaque puits.
- Lecture : La densité optique (DO) de chaque puits était lue à 450nm.

- **Avantages et inconvénients :**

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Réalisation rapide	Nature et qualité des antigènes
Technique quantitative.	Problème de fixation des Anticorps non spécifique
Peuvent être automatisable	Problème de standardisation
Réalisation d'une grande série d'analyses	Coût élevé

Tableau V-2 Avantages et inconvénients d'ELISA

### V.2.3.2 IFI :



- Préparation du test
  - Tous les réactifs et échantillons sont amenés à température ambiante (20-25°C).
  - Préparation de solution de dilution en diluant avec l'eau distillé
  - Préparation des échantillons des patients en diluant à 1/80 par solution de dilution
- Exécution du test
  - Etiquetage des lames.
  - Addition d'une goutte de control positifs, négatif non dilué et les dilutions des échantillons patients respectivement sur les puits 1, 2...12.
  - Incubation 30 minutes dans la chambre humide à température ambiante.
  - Rinçage des lames à l'aide d'une pissette rempli avec solution de lavage, placés ensuite dans une fiole de Coplin d'amortisseur dilué pendant jusqu'à 5 minutes.
  - Addition du conjugué fluorescent après élimination de l'excès de solution de lavage en secouant la lame et ré-incubation les lames pendant 30 minutes.
  - Lavage. Placer les lames dans fiole de Coplin remplie par solution de lavage diluée, deux fois 5 minutes, séparées par une fois dans une fiole de Coplin remplis cette fois par solution de lavage additionnée de contre colorant (Bleu d'Evans) pendant 5 minutes.
  - Montage de la Lame
- Lecture : à l'aide du microscope fluorescent

- **Avantages et inconvénients :**

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Facilité d'exécution : deux incubations de 30 minutes entrecoupées de lavages	Investissement dans un microscope à fluorescence avec des objectifs de qualité.
Sensibilité : la sensibilité de l'IFI est élevée	Le caractère non automatisable pour la totalité de la méthode avec le nécessaire contrôle de qualité de chaque étape.
Possibilité de détecter plusieurs anticorps en même temps	L'expertise de lecture indispensable à une interprétation pertinente des résultats.
Maintien de l'antigène dans sa conformation native	Le biologiste doit connaître toutes les caractéristiques de coffret pour pouvoir interpréter.

Tableau V-3 Avantages et inconvénients d'IFI

## V.2.4 Interprétation et limites des tests

### V.2.4.1 ANA-ELISA

- **Interprétation :**

La valeur seuil de positivité était prise selon les recommandations du fabricant à 20 UI.

Négatif	< 20UI
Modérément positif	20-60UI
Fortement positif	>60UI

- **Limites du test :**

-La présence de Complexes Immuns ou d'autres agrégats d'Immunoglobulines dans le sérum humain peut entraîner l'augmentation d'une liaison non spécifique et des résultats faussement positifs.

-Tous les patients atteints de connectivites ne sont pas nécessairement ANA positifs.

-Les résultats obtenus à l'aide de ce test devront être corrélés avec les signes cliniques et d'autres tests sérologiques.

-La spécificité d'un sérum positif ne peut pas être déterminée à l'aide de ce test. Il est recommandé d'utiliser d'autres tests pour déterminer la spécificité.

- Les sérums de contrôle de ce coffret sont RNP positifs. Cet antigène est l'un des plus sensibles à la dégradation. De ce fait, ces contrôles permettent une mesure sensible de l'intégrité de l'antigène.

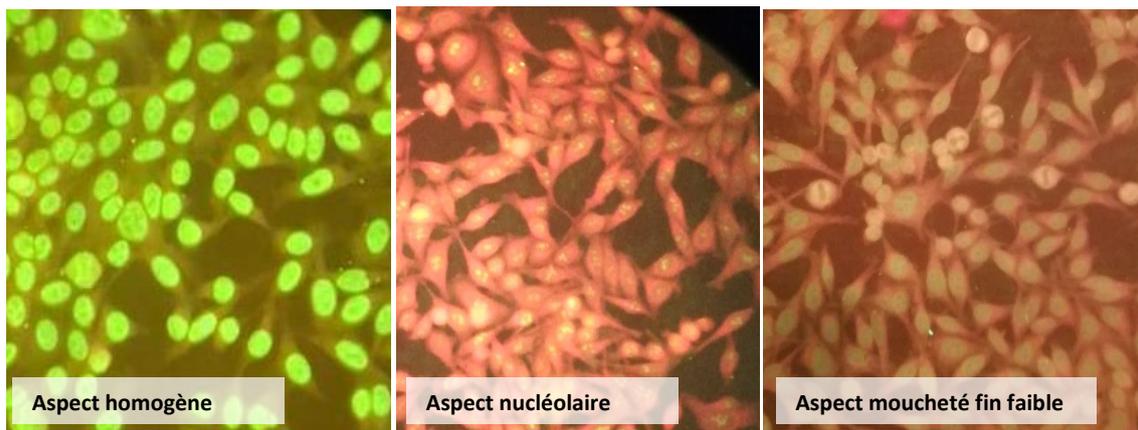
D'autres contrôles peuvent être utilisés en plus pour suivre le niveau des différents antigènes selon le choix du laboratoire

-Les performances du coffret pour les échantillons autres que les sérums n'ont pas été établies.

#### V.2.4.2 IFI sur Hep-2

- **Interprétation :**

La limite de positivité était une dilution de 1/80. Les lames sont lues après validation du test selon l'aspect des témoins positif et négatifs. Les différents aspects de fluorescence étaient observés : L'aspect homogène, moucheté, nucléolaire, centromérique, cytoplasmique.



- **Limites du test :**

-Des titres élevés en ANA sont généralement associés à des connectivites mais avant d'établir un diagnostic, il est recommandé de vérifier les autres marqueurs et signes cliniques du patient.

-Les autoanticorps anti SS-A ne sont pas détectables par IFI sur Hep-2

-Un faible pourcentage de LES peut présenter un résultat négatif pour la recherche des ANA par technique d'immunofluorescence indirecte bien que l'on puisse mettre en évidence des ANA par d'autres méthodes

-Les patients avec un LES médicalement induit peuvent présenter un aspect homogène ou périphérique lors de la recherche des ANA. Lors de corticothérapie, les sérums de patients peuvent donner des résultats négatifs

-Plus d'un auto-anticorps peut être présent dans un échantillon de patient. La dilution du sérum permet de discerner plus facilement tous les marquages. De même, à des titres très élevés, un effet de zone peut masquer le vrai titre/résultat. Tous les échantillons suspectés comme donnant des résultats à un titre faible doivent être redilués.

-La qualité des filtres, des optiques et de la source lumineuse peut influencer la sensibilité du test. Les performances du microscope sont dépendantes du bon entretien et plus particulièrement du centrage et du changement de la lampe.

-Des taux bas d'ANA peuvent être détectés chez des patients ayant des signes cliniques autres que pour la maladie rhumatoïde ou les connectivites. Le taux d'incidence des résultats positifs en ANA augmente avec l'âge chez les sujets normaux.

-Au moment de l'interprétation des aspects, la possible présence de plusieurs autoanticorps spécifiques doit être prise en compte. L'association d'autoanticorps différents peut induire un aspect homogène ou moucheté et il est recommandé d'effectuer la recherche des anti-ADN double brin et des antigènes nucléaires solubles (ENA) à partir de tous les échantillons présentant un aspect homogène.

-Bien qu'une dilution 1/80 de sérum patient soit habituellement employée pour le dépistage, il est possible que de la fluorescence faible, non spécifique au niveau des noyaux puisse se produire chez quelques échantillons à de faibles dilutions.

-La recherche des ANA n'apporte qu'une aide au diagnostic et ne constitue pas un diagnostic en soit. Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte du contexte clinique. Les lames vendues séparément sont classées comme « réactifs spécifiques d'analyte ». Les caractéristiques analytiques et de performances ne sont pas établies, sauf comme élément de la trousse.

### V.2.4.3 ENA 6 ELISA

- **Interprétation :**

Les recommandations du fabricant était suivi pour un seuil de positivité de 20 UI.

Négatif	< 20UI
Faiblement positif	20-39UI
Modérément positif	40-80UI
Fortement positif	>80UI

- **Limite du test :**

-La présence de complexe immuns ou d'autre agrégats d'immunoglobulines dans le sérum humain peut entraîner une augmentation d'une liaison non spécifique et des résultats faussement positifs.

-Tous les patients atteints de LES ou présentant le SGS ne sont pas anti SM, SS-A, SS-B, Scl-70 ou Jo-1 positifs.

-Les résultats devront être corrélés avec les signes cliniques et d'autre test sérologique.

-Certains échantillons pourraient avoir un taux d'anticorps individuel anti Sm, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70 ou anti Jo-1 inférieurs au seuil pour chacun des tests spécifiques mais ils sont positifs pour le test ENA6-ELISA par un effet cumulatif.

-Les performance du coffret pour les échantillons autres que les sérums n'ont pas été établies.

### V.2.4.4 ENA Profile

- **Interprétation :**

La limite de positivité était de 12 UI selon le fabricant.

Négatif	< 8.0UI
Douteux	8.0-12UI
Positif	>12UI

- **Limite du test :**

-Le kit est utilisé uniquement comme aide au diagnostic. Un résultat positif suggère certaines maladies devraient être confirmées par des résultats cliniques.

-Les résultats obtenus à partir de ce test ne constituent pas une preuve diagnostique de la présence ou de l'absence de maladie.

**V.2.4.5 dsDNA SC ELISA****Interprétation :**

Un résultat positif correspond à une concentration supérieure à 75 UI/ml.

Négatif	< 30UI
Douteux	30-75UI
Positif	>75UI

**Limite du test :**

- Le kit est utilisé uniquement comme aide au diagnostic. Un résultat positif suggère certaines maladies devraient être confirmées par des résultats cliniques.
- Les résultats obtenus à partir de ce test ne constituent pas une preuve diagnostique de la présence ou de l'absence de maladie.
- Les résultats limites doivent être répétés, soit avec un nouvel échantillon, soit à une date ultérieure. Il est important de tester régulièrement les patients afin de surveiller les modifications du niveau d'auto-anticorps anti-ADNdb.

**V.2.4.6 Histone ELISA****Interprétation :**

La limite de positivité est une concentration de 1,5 UI/ml.

Négatif	< 1.0UI
Faiblement positif	1.0-1.5UI
Modérément positif	1.5-2.5UI
Fortement positif	>2.5UI

**Limite du test :**

- La présence de complexe immuns ou d'autre agrégats d'immunoglobulines dans le sérum humain peut entraîner une augmentation de liaison non spécifique et des résultats faussement positifs.
- Tous les LES ou Lupus induit par les médicaments ne sont pas positifs pour les anticorps anti-histones.
- Les résultats obtenus doit être corrélés avec les signes clinique et d'autres tests sérologiques.
- Les performances du coffret pour les échantillons autres que les sérums n'ont pas été établies

#### **V.2.4.7 AESKULISA Nucleo-h**

##### **Interprétation des résultats :**

Un résultat positif correspond à une concentration supérieure à 18 UI/ml.

#### **V.3 Critères de jugement :**

Nous avons considéré comme vrais positifs tous les sérums révélés positifs par au moins deux test des trois tests réalisés (Screening par IFI, Screening par ELISA, test d'identification).

## VI. CHAPITRE : Résultat et discussions

### VI.1 Répartition des patients selon le sexe :

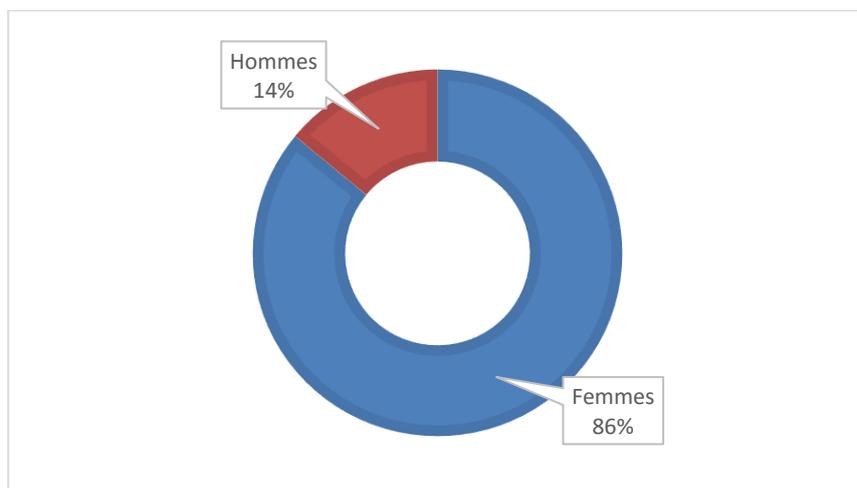


Figure VI-1 Répartition des patients selon le sexe

- **Résultat :**

Notre population d'étude était à 86% des femmes, le sexe masculin représente que 14%.

### VI.2 Répartition des patients selon l'âge :

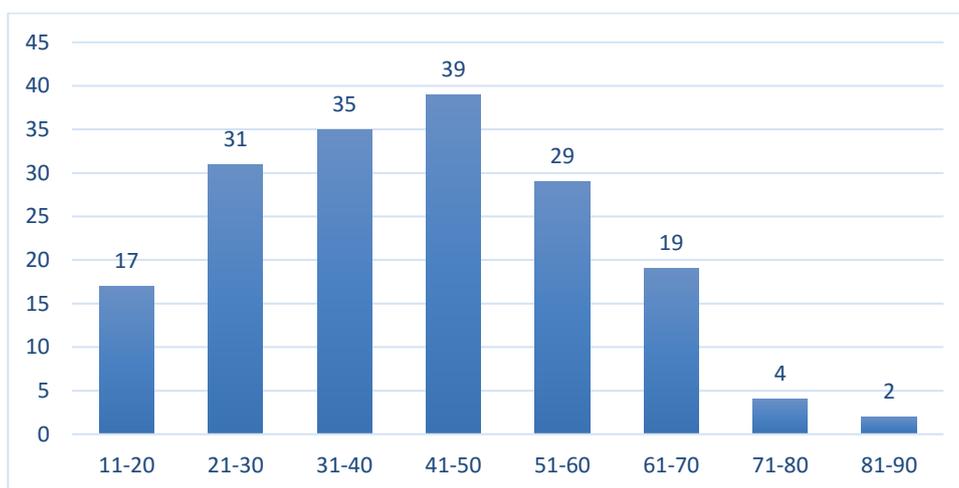


Figure VI-2 Répartition des patients selon l'âge

- **Résultats :**

L'étendue d'âge dans notre étude était de 74ans, à partir de l'âge de 11 ans.

L'intervalle d'âge fréquent était [41,50ans], la moyenne d'âge de notre population étudiée est à 32ans.

Répartition selon les signes cliniques	%
Signes articulaires <i>Arthralgies Arthrites Synovites Déformations Dérouillage matinale</i>	41
Signes cutanéomuqueux <i>Érythème Photosensibilité Raynaud Sècheresse Chute des cheveux Purpura Pétéchie</i>	25
Signes hématologiques <i>Thrombopénie ,Leucopénie ,Thrombose</i>	18
Signes généraux <i>Asthénie Amaigrissement Fièvre Anorexie</i>	15
Signes cardiorespiratoires <i>Dyspnée, Tachycardie, Pleurésie, péricardite, syndrome interstitiel</i>	10
Autre <i>Hépatique ,Rénale</i>	5

Tableau VI-1 Répartition selon le motif de demande

### VI.3 Répartition des patients selon les signes cliniques :

- **Résultats :**

Le motif d'orientation le plus fréquent est les poly-arthralgies inflammatoires ; éventuellement associé à une atteinte de l'état général, rénale, hépatique, pulmonaire, des signes hématologiques et cutanéomuqueux.

- **Discussion :**

Les signes cliniques chez les patients suspectés d'avoir une connectivite est très polymorphe. Nos résultats sont similaires à celui obtenu dans une étude en Tunisie mené par *Feki et al.(2012)* [76] ou les signes articulaires étaient les signes d'appel les plus fréquents chez cette population, suivis par les signes cutanéomuqueux.

## VI.4 Répartition des patients selon la présence d'AAN :

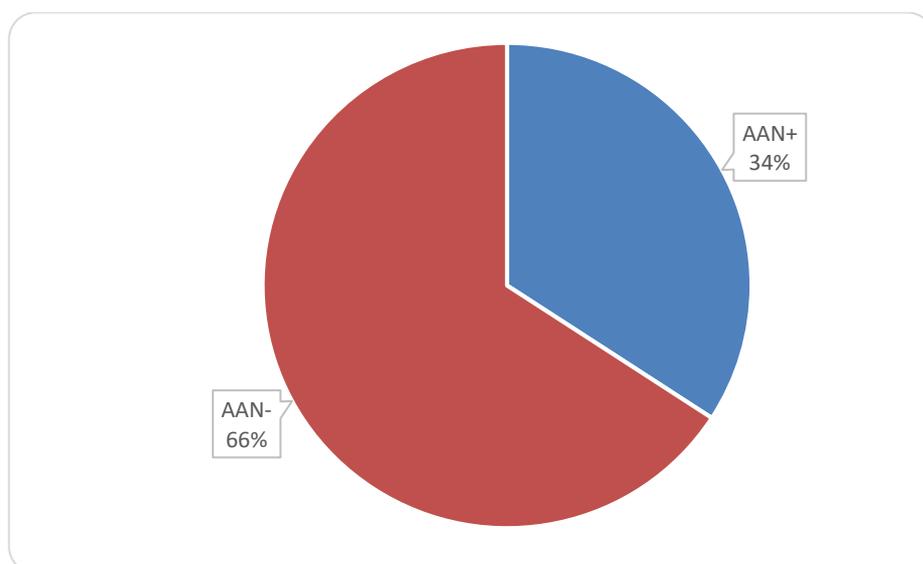


Figure VI-3 Répartition des patients selon la présence d'AAN

- **Résultat :**

Parmi nos 348 patients, 120 patients présentent des AAN positif (à savoir 34%).

- **Discussion :**

La prévalence des AAN chez des sujets sains est estimée à 13% (à une dilution du sérum de 1/80<sup>ème</sup>) [78] de ce fait un résultat positif d'AAN doit être confronté aux restes des données cliniques liés au patient.

Tous nos patients avaient une suspicion de connectivite bien que seulement 34% s'avéraient AAN positif (**Figure VI.4**). Une discordance clinico-biologique est de ce fait notée chez 66% de nos patients.

Cependant l'absence d'AAN dans le sérum du sujet n'élimine pas une éventuelle connectivite sauf dans les cas où les marqueurs biologiques de la maladie sont quasi-constants (100% des cas) notamment au cours du lupus induit médicamenteux qui est associé aux auto-anticorps anti-histone, et la connectivite mixte associée aux auto-anticorps anti-U1snRNP.

Ainsi que dans le LES, le SGS et la sclérodermie où les AAN sont positifs chez 95-100%, 80-90%, 60-90% des malades, respectivement. Dans ces cas un résultat négatif d'AAN oriente vers un autre diagnostic comme le décrit l'étude de *Solomon et al.* [34].

## VI.5 Répartition des patients présentant des AAN positifs selon le sexe :

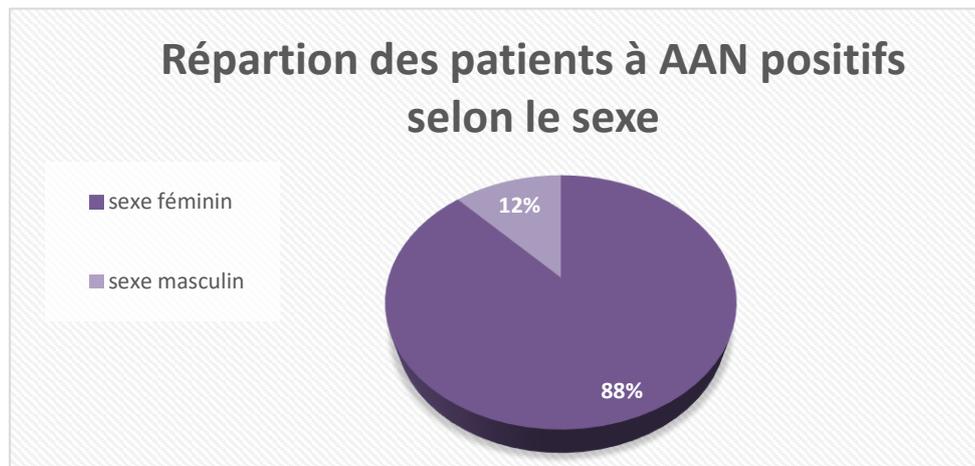


Figure VI-4 Répartition des patients étudiés et AAN positif selon le sexe

- **Résultat :**

Parmi les patients à AAN positifs 88% étaient de sexe féminin et seulement 12% étaient de sexe masculin. Le sex-ratio est à 6F/H.

- **Discussion :**

Les connectivites, comme décrits dans la littérature sont de prédominance féminine constante, avec un sex-ratio femmes/hommes variant de 3/1 dans la sclérodémie, à 9/1 pour le LES [73]. Cette prédominance est expliquée, dans l'article *d'Invernizzi et al*, par l'implication des hormones sexuelles et du terrain génétique notamment le chromosome X comportant de gènes impliqués dans le maintien de la tolérance immunitaire. Ainsi certains gènes portés par le chromosome X pourraient favoriser l'auto-immunité, comme en témoigne la fréquence élevée des maladies auto-immunes du syndrome de Turner (XO) [74].

Dans notre étude la sex-ratio pour des patients avec suspicion clinique de connectivite était de 6 femmes pour un homme. Le résultat obtenu concorde avec celui décrit dans l'étude de *Kane et al. (2016)* [77] où le sex-ratio femme/homme chez des patients africains atteints de MAI systémique était 7 femmes pour un homme.

## VI.6 Répartition des patients présentant des AAN positifs selon l'âge :

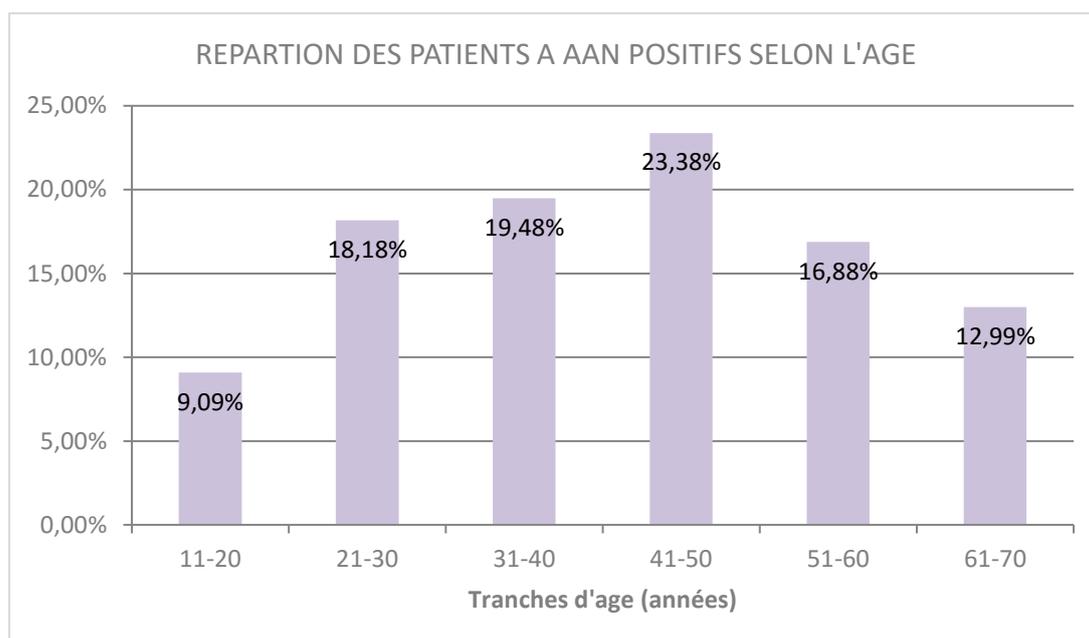


Figure VI-5 Répartition des patients ayant des AAN positifs selon l'âge

- **Résultats :**

Les extrêmes d'âge dans notre population étaient : 11 et 85 ans.

Parmi les patients présentant des AAN positifs, le pic de fréquence est observé chez les patients entre 41 à 50 ans, avec une moyenne d'âge de 42 ans.

Le **tableau VI.2** montre la fréquence de positivité dans chaque tranche d'âge. Cette dernière était 52% chez les sujets âgés entre 61 et 70 ans, et 45% chez les sujets de 21 à 30 ans.

Tranches d'âge (années)	Patients étudiés	AAN positifs
11-20	17	6(35%)
21-30	31	14(45%)
31-40	35	15(43%)
41-50	39	15(38%)
51-60	29	12(41%)
61-70	19	10(52%)
>70	6	0

Tableau VI-2 Répartition des patients AAN positifs selon chaque tranche d'âge

- **Discussion :**

Les connectivites peuvent survenir à tout âge, mais chez la femme, préférentiellement en période d'activité ovarienne, avec un pic de fréquence entre 10 et 40 ans pour le lupus érythémateux systémique et entre 30 et 50 ans pour la sclérodermie [2]. Le SGS s'observe surtout autour de la période de la ménopause, avec un âge moyen lors de l'apparition du premier symptôme de 43 ans [18,2], ce qui est similaire à notre population où la moyenne d'âge était à 42 ans.

La prévalence des AAN augmente avec l'âge, en particulier après 65 ans, même en dehors de tout contexte pathologique [18,2], ce qui observable dans notre population où 52% des patients d'un âge entre 61 et 70 ans étaient AAN positifs.

Notre résultat est comparable à celui obtenu dans une étude menée en Sénégal par *Kane et al.*(2016) sur 724 patients atteints de connectivites où la moyenne d'âge était 43,8 ans [77].

## VI.7 Répartition des patients selon la détection d'AAN par technique IFI et technique ELISA :

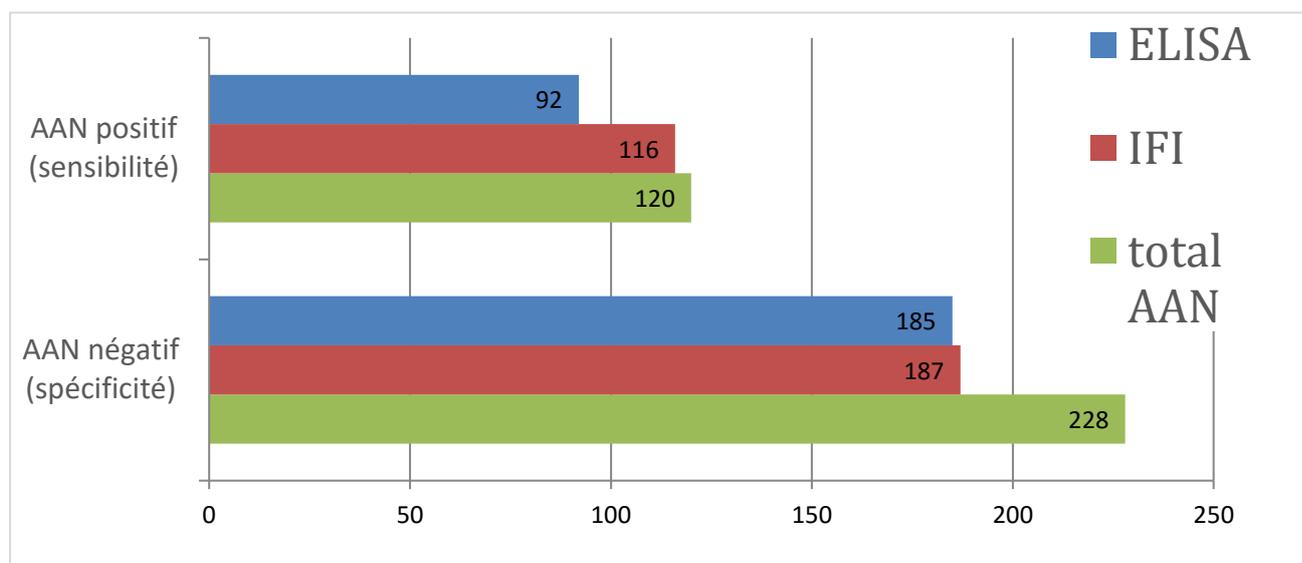


Figure VI-6 Répartition de la sensibilité et la spécificité d'IFI et d'ELISA

- Résultat :**

Parmi les 120 patients présentant des AAN positifs, la recherche d'AAN par ELISA sur ANA-ELISA a révélé 92 patients avec AAN positifs ; tandis que la technique l'IFI sur HEp-2 détectait 116 patients avec AAN positifs selon le seuil de positivité de 1/80. Ainsi, parmi les 228 patients considérés comme négatifs en AAN, l'ANA-ELISA a correctement détecté 185 patients AAN négatif, alors que l'IFI a révélé 187 patients vrais négatifs (**tableau VI.3 et VI.4**). Par conséquent, La sensibilité et la spécificité des deux techniques dans la recherche des AAN étaient calculées (**Tableau VI.5**):

- Sensibilité de la technique IFI était **96,6%**,
- Sensibilité de la technique ELISA était **76,6%**,
- Spécificité de l'IFI était **82%**,
- spécificité de l'ELISA était **81,1**.

Technique	AAN+	AAN-
Positif	VP	FP
Négatif	FN	VN
<b>Total</b>	<b>VP+FN</b>	<b>FP+VN</b>

ELISA	AAN+	AAN-
Positif	92	43
Négatif	28	185
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>228</b>

Tableau VI-3 Sensibilité et spécificité de l'ELISA

IFI	AAN+	AAN-
<b>Positif</b>	116	41
<b>Négatif</b>	4	187
<b>Total</b>	120	228

Tableau VI-4 Sensibilité et spécificité de l'IFI HEP-2

	ANA-ELISA	IFI sur Hep-2
<b>Sensibilité<sup>1</sup></b>	76.6%	96.6%
<b>Spécificité<sup>2</sup></b>	81.1%	82.0%
<b>VPP<sup>3</sup></b>	68%	74%
<b>VPN<sup>4</sup></b>	87%.	98%.

Tableau VI-5 Comparaison de la performance de l'IFI et l'ELISA dans la détection des AAN

- **Discussion :**

Dans notre étude, la recherche des AAN par technique IFI sur HEP-2 a pu détecter 24 AAN vrais positifs supplémentaires à ceux détectés par le screening initial par ANA-ELISA.

Tandis que 4 patients avec AAN positifs n'ont pas été détectés par IFI mais s'avéraient positifs par ELISA, trois entre eux présentaient un auto-anticorps anti-SSA. Ce résultat confirme le manque de sensibilité de la technique IFI sur lame HEP2 pour la détection des auto-anticorps anti-SSA (60KDa) d'où l'intérêt de l'utilisation des lames HEP2000 qui offrent une meilleure sensibilité pour la détection des anti-SSA (60KDa).

On souligne une nette supériorité de sensibilité de l'IFI (96,6%), par rapport à celle du test ANA-ELISA (76,6%).

La sensibilité diminuée de l'ANA-ELISA peut être due aux facteurs suivants :

- La nature des antigènes : les antigènes utilisés sont des antigènes purifiés et non pas natifs.
- Les antigènes présentés dans ce test sont limités à ceux avec valeur diagnostique définie (nucléosomes, ADNdb, histones, Sm/RNP, SSA, SSB, Scl70, centromère, PCNA, Jo-1,

<sup>1</sup> Sensibilité =  $Se = VP / (VP + FN)$

<sup>2</sup> Spécificité =  $Sp = VN / (FP + VN)$

<sup>3</sup> Valeur prédictif positif,  $VPP = VP / (VP + FP)$

<sup>4</sup> Valeur prédictif négatif,  $VPN = VN / (VN + FN)$

mitochondrie M2 et ribosome P), les anticorps à cible antigénique non identifiée ne sont pas détectés.

-La méthode d'immobilisation de l'antigène, une adsorption simple sur plaque de polystyrène peut diminuer la sensibilité du test [52].

Par ailleurs, le panel d'identification disponible limite la spécificité de la technique IFI dont le substrat (cellule HEp2) pour la recherche des AAN offre plus de 100 antigènes alors que le panel d'identification ne couvre que 12 antigènes.

Le test ANA-ELISA a montré une spécificité comparable à l'IFI sur HEp-2. La spécificité dépend de la pureté de l'antigène, de sa stabilité, de son immunoréactivité et de la façon dont cet antigène est présenté dans le test [52]. Les méthodes d'extraction, de purification et de fixation varient selon le fabricant et influence la qualité de l'antigène et donc la spécificité [75].

Ce résultat est en accord avec celui trouvé dans une étude similaire par *Kumar et al.* Dans cette étude la sensibilité de l'ANA-ELISA était moindre que celle de l'IFI dans le dépistage d'AAN avec une sensibilité plus faible de la technique ELISA(46%) mais une spécificité plus grande (99.5%) que celle retrouvée dans notre étude [73].

De plus, l'**ACR** dans son énoncé de position (annexes), retient l'IFI sur HEp-2 comme le gold standard dans la recherche des AAN du fait de sa bonne sensibilité, sachant que les cellules HEp-2 sont le substrat universel pour la recherche d'AAN.

Une étude similaire de *EMLEN & O'NEILL (1997)* comparative entre l'IFI HEp-2 et 6 différents kits commerciaux d'ANA-ELISA a montré une spécificité qui diffère largement d'un kit à l'autre variant entre 54% à 96% [75].

## VI.8 Répartition des patients selon l'aspect et le titre retrouvés par IFI :

### VI.8.1 Aspects et titres chez tous les patients positifs par IFI :

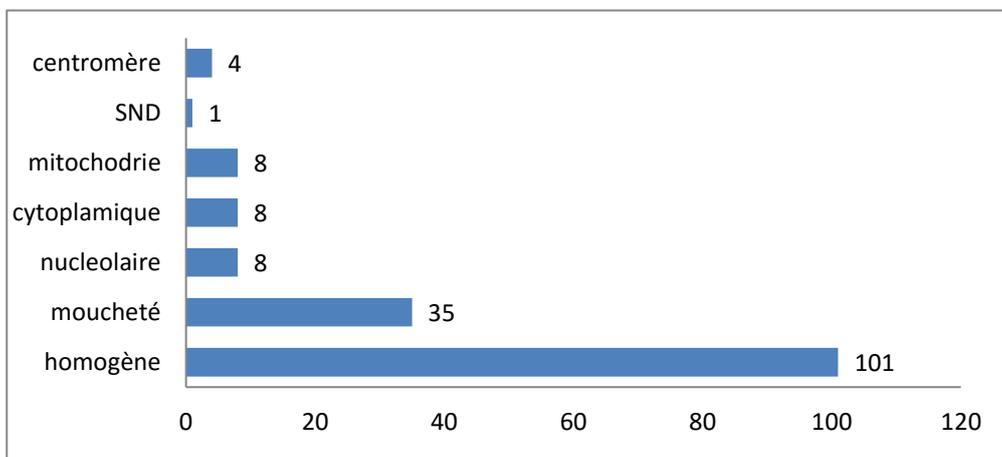


Figure VI-7 Aspects des patients IFI positifs

- **Résultats :**

L'aspect homogène était le plus fréquent (101 patients), suivi par l'aspect moucheté avec enregistrement de 35 patients, les aspects nucléolaire, mitochondrial, cytoplasmique et centromérique sont peu retrouvés. On note que certains patients avaient un chevauchement d'aspect.

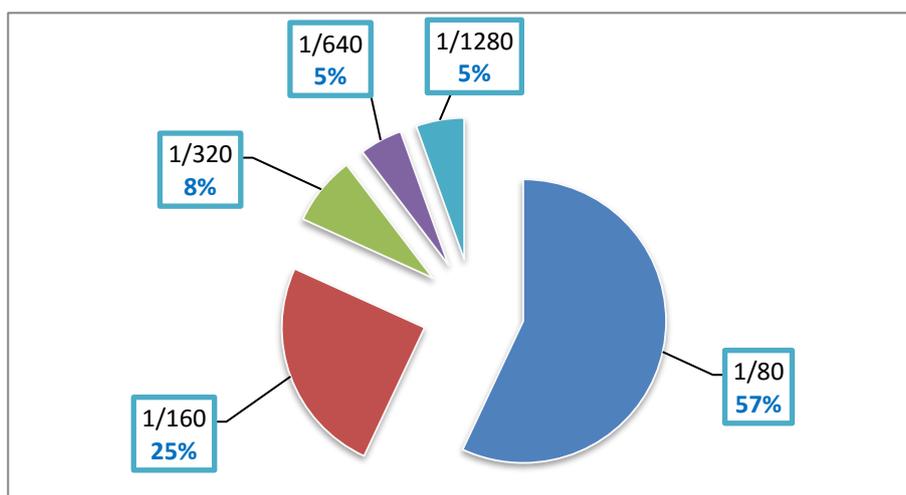


Figure VI-8 Fréquence des titres sur IFI HEp-2

- **Résultats :**

Les titres faibles représentent la plus grande fréquence. Cette fréquence diminue quand le titre augmente.

	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	Totale
Homogène	60	26	10	2	3	101
Moucheté	15	12	1	5	2	35
Nucléolaire	6	1	1			8
Cytoplasmique	8					8
Mitochondrie	3	1	1		3	8
SND		1				1
Centromère	2			1	1	4
Totale	94	41	13	8	9	165

Tableau VI-6 Aspects et titres chez tous les patients positifs par IFI

- **Discussion :**

La présence d'un titre élevé réduit l'effet parasite de certains aspects non spécifique à faible titre. Les titres faibles peuvent être présents chez des sujets sains, âgés ou atteints de pathologies autres que les connectivites.

L'aspect homogène est le plus fréquent (61%), ça peut être expliqué par le fait que l'aspect homogène (1/640) peut se superposer à un autre aspect et le cacher.

Nos résultats corroborent avec ceux de l'étude menée par *Feki et al.* où l'aspect homogène avec un titre de 1/80 était le plus fréquent.

Les aspects de fluorescence retrouvés dans notre étude se rapprochent de ceux décrits dans l'article de *Magdelaine et al.* (2006).

### VI.8.2 Répartition selon l'aspect et le titre des patients présentant des AAN positifs par IFI et négatifs par ELISA :

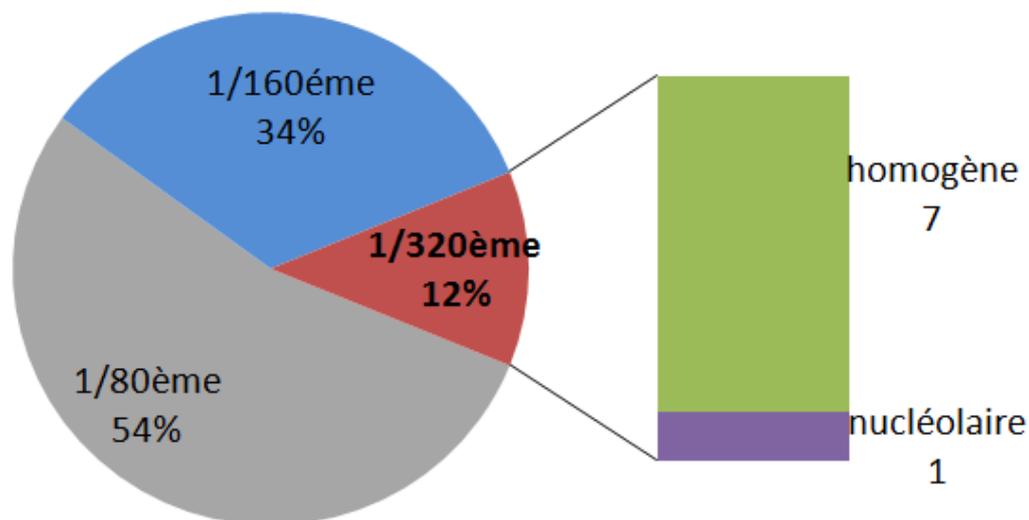


Figure VI-9 Titres des patients ELISA négatif sur IFI HEp-2

- **Résultats :**

Dans notre étude, 1/80<sup>ème</sup> est le titre le plus observé avec un pourcentage de 54%, suivie par le titre 1/160<sup>ème</sup> puis le 1/320<sup>ème</sup> avec pourcentage respectivement 34 et 12%

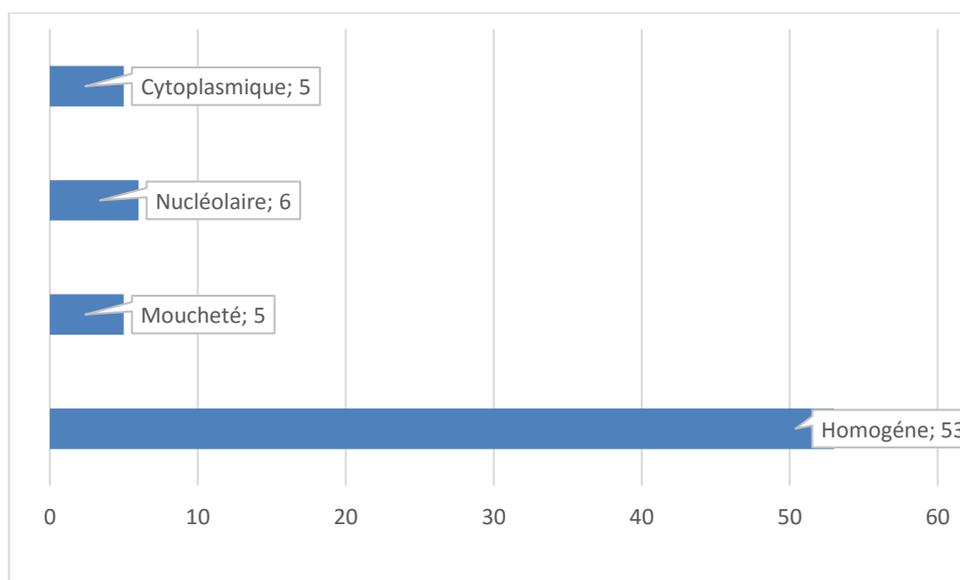


Figure VI-10 Fréquence d'aspects sur IFI HEp-2 des patients ELISA négatifs

- **Résultat :**

53 des patients non détectés par ANA-ELISA avaient un aspect homogène. L'aspect nucléolaire, cytoplasmique et moucheté étaient également présents.

- **Discussion :**

Dans notre population, 54% des patients dont la recherche des AAN était négative par ANA-ELISA sont revenus positifs par IFI avec un aspect homogène à faible titre à savoir 1/80<sup>ème</sup>.

Cependant le reste des patients (46%) avaient des titres significatifs compris entre 1/160 et 1/320 par IFI.

Parmi ces patients, 12% présentaient un titre de 1/320<sup>ème</sup> (8 patients), dont 7 patients avaient un aspect homogène et 1 patients avait un aspect nucléolaire.

## VI.9 Répartition des patients selon la présence des cibles antigéniques :

### VI.9.1 Cible antigénique la plus fréquente :

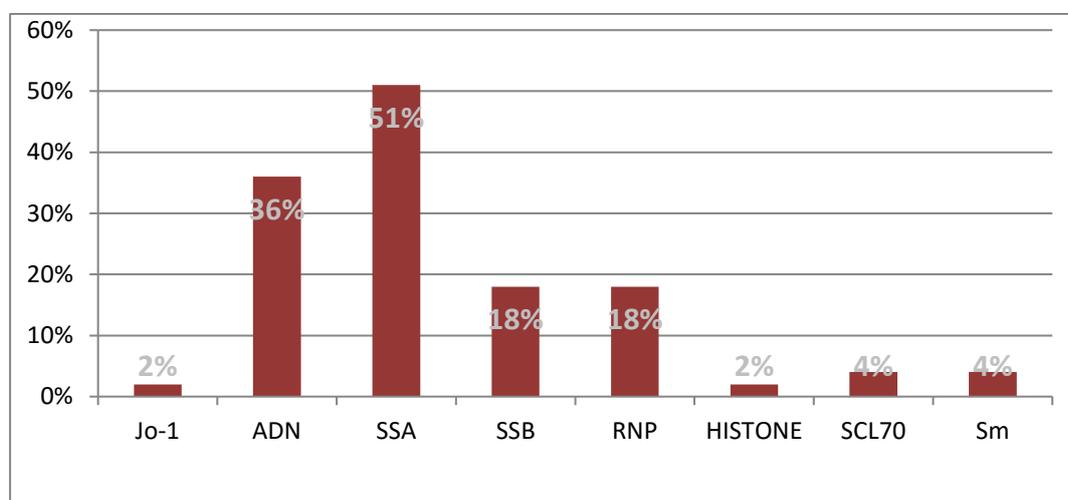


Figure VI-11 Fréquence des différents cible antigéniques

- **Résultat :**

Dans notre population, L'auto-anticorps le plus fréquent était l'anti-SSA seul ou associé, suivi par l'anti-dsADN, les anti-RNP, et les anti-SSB.

• **Discussions :**

La fréquence de l’anti-SSA peut être expliquée par le fait qu’il soit fortement associé au SGS (80-90% des cas) [34], qui a la plus grande fréquence entre les connectivites après la PR [19] pendant laquelle les AAN ne sont positif que dans 40-60% des cas [34]. De plus cet auto-anticorps n’est pas spécifique et peut être rencontrée au cours de toutes es connectivites.

Notre résultat est en accord avec une étude similaire de *Peene et al. (2000)* où les anti-SSA étaient la spécificité antigénique avec la plus fréquente [11].

**VI.9.2 Répartition des patients à cible antigénique monospécifique :**

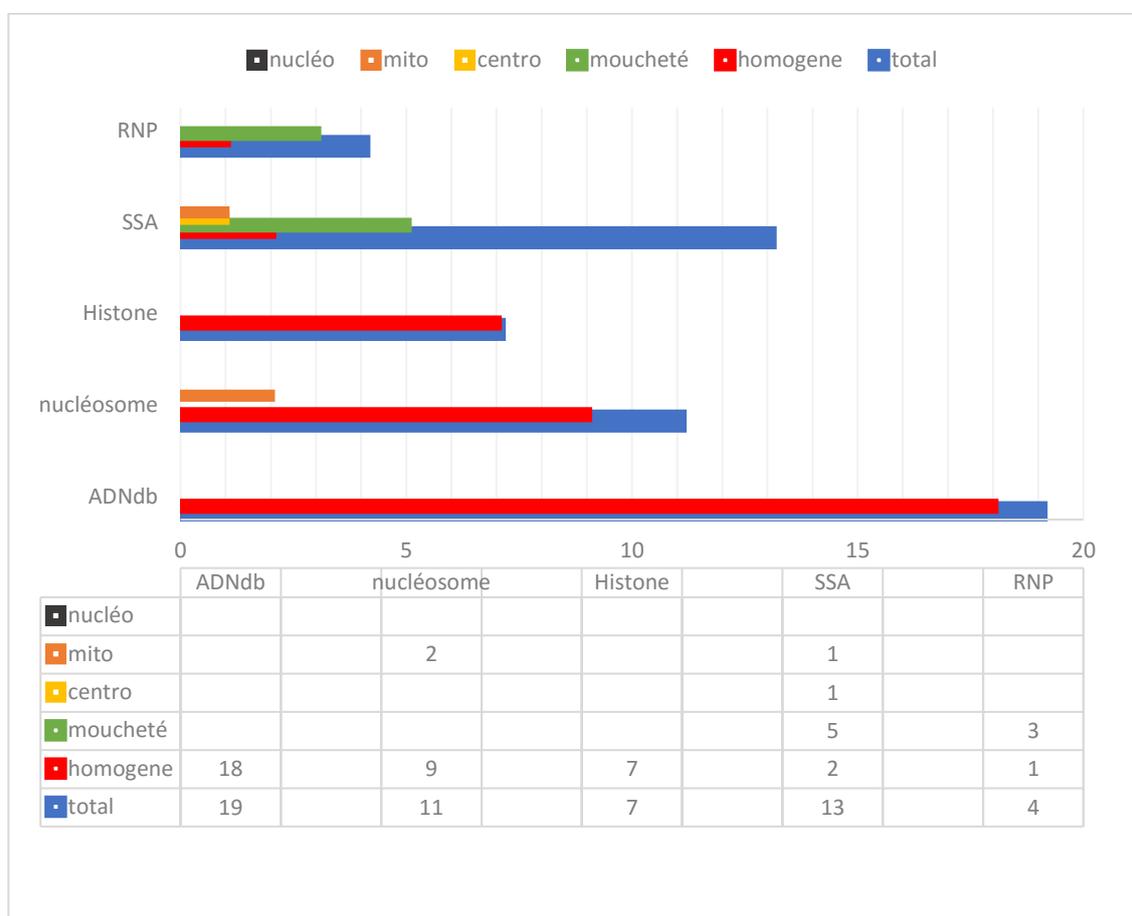


Figure VI-12 Patients à cible antigénique monospécifique et résultats sur IFI Hep-2

• **Résultat :**

L’identification des cibles antigéniques par les différents tests exécutés lors de notre étude a donné 54 patients dont les cibles antigéniques étaient monospécifiques :

L’IFI sur Hep-2 a réussie a objectivé 93.9%.

La recherche des auto-anticorps anti-ADNdb par DNALISA a détecté 19 patients positifs dont 18 présentent un aspect homogène sur IFI Hep-2.

Le AESKULISA nucleo-h (ADNdb et histone) donne 11 sujets positifs ,9 ont été observés homogènes et les 2 autres ont un aspect nucléolaire par la technique IFI sur Hep-2

La technique IFI sur Hep-2 a objectivé 9 patients SS-A positifs sur la totalité de 13 patients dont les aspects : 5 patients mouchetés, 2 homogènes, 1 mitochondrial et un nucléolaire.

L'anti-RNP étaient totalement détectable par la technique IFI, sur 4 patients 3 entre eux présentent un aspect moucheté, l'autre avait un aspect homogène.

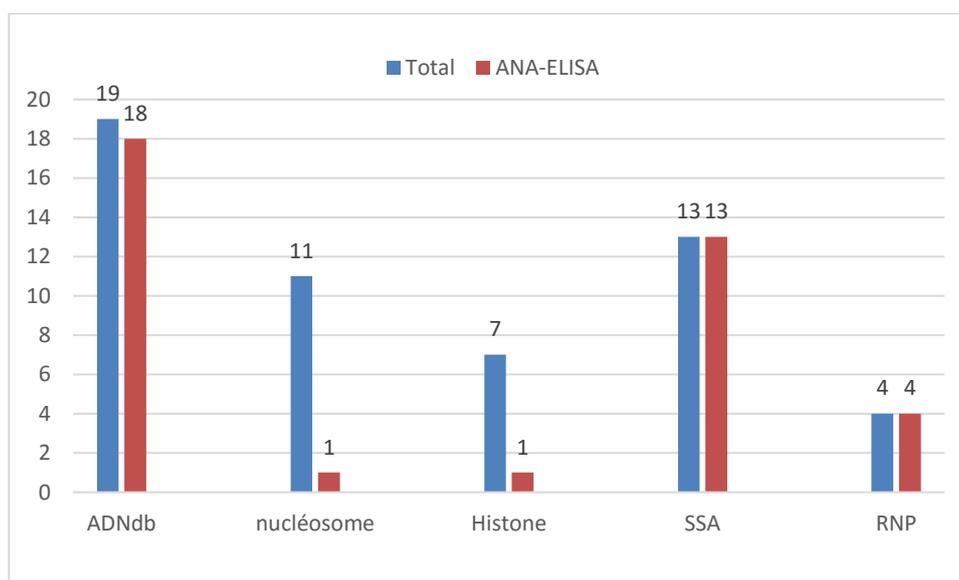


Figure VI-13 Patients à cible antigénique monospécifique et résultats sur ANA ELISA

- **Résultats :**

La technique ANA-ELISA a pu révéler 37 patients qu'avaient une cible antigénique unique sur 54 patients.

La technique ANA-ELISA a pu objectiver la totalité des patients présentant le cible antigénique SSA et RNP.

18 patients ont été trouvés positifs par ANA-ELISA sur 19 patients présentant comme cible antigénique l'ADNdb

Sur 11 patients nucléosome positifs comme sur 7 patients histone positifs, l'ANA-ELISA n'a pu détecter qu'un seul patient.

- **Discussion :**

La technique IFI sur cellules Hep-2 offre la possibilité d'apprécier l'aspect des anticorps, qui nous oriente vers les examens complémentaires (par exemple aspect moucheté sera complété par ENA-6 screen), aussi elle nous donne idée sur la gravité de l'état de patient en connaissant le titre de ces anticorps, en revanche la technique ELISA ne peut offrir que la concentration de tous les anticorps présents dans le sérum des patients.

Pour l'ADNdb les deux techniques IFI sur HEp-2 et l'ANA-ELISA présente une sensibilité comparable (18 patients détectés sur 19), L'ADNdb s'observe avec aspect homogène explique de fait que l'ADN recouvre la totalité de noyaux (antigène insoluble)

La technique ANA-ELISA est peu sensible aux anticorps anti-nucléosome et l'anti-histone. La différence entre les tests nucleo-h (ADNdb + histone) et histone montre 4 autres patients ADN positif par rapport d'élimination.

L'antigène SS-A est peu détectable par technique IFI sur Hep-2 et ça représente l'un de ces inconvenants, alors que ANA-ELISA a détecté la présence de la totalité des sérums SS-A positifs.

L'anti-RNP est détectable avec les 2 techniques, observé sur IFI avec un aspect moucheté parce que le RNP est un antigène soluble.

### **VI.9.3 Cible antigénique non détectées par la technique IFI sur Hep-2**

- **Résultat :**

Au cours de la recherche des AAN par IFI sur HEp-2, cette dernière a détecté 76 patients parmi un total de 82, avec cible antigénique identifié.

6 patients révélés positifs lors de l'identification, sont revenus négatifs lors de la recherche d'AAN par IFI sur HEp2. 4 parmi eux avaient comme cible antigénique des anticorps anti-SSA.

- **Discussion :**

Les faux négatifs par IFI étaient dans leur quasi-totalité des anti-SSA résultat en accord avec l'article de *Peene et al. (2000)* [11] qui montre que le test IFI-HEp2 manque de sensibilité pour les anti-SSA (60KDa) associé au SGS d'où l'intérêt de l'utilisation des kits HEp2000 qui offrent une meilleure sensibilité.

		<b>ANA-ELISA</b>		<b>Total</b>	<b>Spécificité identifiés</b>
		Positifs	Négatifs		
<b>IFI Hep-2</b>	Positifs	88	69	157	76
	Négatifs	47	144	191	6
<b>Total</b>		135	213	348	82
<b>Spécificité identifiés</b>		53	29	82	

Tableau VI-7 Comparaison de l'ELISA et IFI pour détection de sérums à spécificité identifiée

## VI.9.4 Cible antigénique non détectées par la technique ELISA

- **Résultat :**

Dans notre étude, 25 patients négatifs par ANA-ELISA et positifs par IFI étaient identifiés :

-8 patients montraient une réactivité anti-ENA-6 faiblement positif (20-39UI/ml), dont un seul avait un titre de 1/320 et 3 avaient un titre de 1/160 par IFI.

-2 patients se révélaient anti-ADNdb positifs avec des taux significatifs. Les deux patients avaient un aspect homogène, dont un présentait un titre de 1/160 par IFI.

-7 patients présentés une réactivité anti-histone, tous fortement positifs, dont 2 avaient un titre de 1/160 par IFI.

-Parmi les deux associations trouvées, L'association anti-ENA6 avec anti-ADNdb était trouvée chez deux patients avec des taux significatifs lors de l'identification, et un aspect homogène par IFI dont un patient avait un titre 1/320 et l'autre un titre de 1/160.

-La deuxième association : ENA6 avec anti-histone était décelée chez 6 patients, 2 entre eux avec des taux significatifs des anti-ENA6 (>40UI/ml), 3 présentaient un titre de 1/160 et un avait un titre de 1/320 par IFI.

<b>Cible antigénique</b>	<b>ANA-ELISA</b>	<b>Total identifiés</b>	<b>Taux significatif dans l'identification</b>	<b>Titre 1/160 dans l'IFI</b>	<b>Titre 1/320 dans l'IFI</b>	<b>Aspects dans l'IFI</b>
<b>anti-ENA-6 seul</b>	Négatif	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	Moucheté (5) Homogène (3)
<b>anti-ADNdb</b>	Négatif	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	Homogène (2)
<b>anti-histone</b>	Négatif	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	Homogène (6) Homogène+Nucléolaire (1)
<b>anti-ENA-6 associé aux anti-ADNdb</b>	Négatif	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	Homogène (1) Homogène+Moucheté (1)
<b>anti-ENA-6 associé aux anti-histones</b>	Négatif	<b>6</b>	<b>2</b> (ENA-6>40UI)	<b>3</b>	<b>1</b>	Homogène (7) nucléolaire (1)

Tableau VI-8 Répartitions selon les cibles antigéniques, taux, titres et aspects des patient AAN négatifs par ELISA positifs avec IFI

- **Discussion :**

L'identification des AAN présente un réel intérêt dans l'orientation du diagnostic différentiel des connectivites. Au niveau de l'unité d'immunologie Hassiba-BENBOUALI, l'investigation est arrêtée si la recherche d'AAN par ANA-ELISA donne un résultat négatif et il est considéré que le patient ne présente pas des AAN.

Parmi la totalité de nos patients, 25 s'avèrent positifs en IFI sur Hep-2, avec cibles antigéniques identifiables, ces mêmes patients ont été considérés comme négatif après recherche par ANA-ELISA.

Les tests d'identification réalisés nous ont décelé les différentes cibles d'AAN qui non pas été détecté par technique ANA-ELISA, un manque de sensibilité de la part de cette dernière est noté pour les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (ENA6) de même que pour les anticorps anti-antigènes nucléaires insolubles (ADNdb, histone). Toutefois parmi ces 25 patients, seulement 13 patients présentaient un taux significatif (fortement positif) lors de l'identification.

Des taux faibles en AAN sont généralement observés au début du développement des connectivites, et au cours des périodes de rémission (pour le LES). De ce fait, les sujets avec des taux faibles, non détectés par ANA-ELISA, peuvent être des malades potentiels, d'où la nécessité de les suivre périodiquement par mesure de prévention pour ne pas arriver aux stades de complications.

Notre résultat en accord avec l'étude similaire de *Kumar et al. (2014)* [73].

## **VI.9.5 Patients présentant des AAN positifs dans le screening par les deux techniques à spécificités non identifiées :**

- **Résultat :**

40 patients du total 348, (11%), étaient positifs par les deux techniques de screening, mais n'étaient pas identifiables par les tests d'identification utilisés.

- **Discussion :**

L'étude de *Feki et al. (2012)* [76] montre l'intérêt diagnostique des AAN même en l'absence de spécificité antigénique connue où un tiers de patients AAN positifs à spécificité non identifiée avaient un diagnostic retenu d'une connectivite, et confirme la place de l'IFI comme examen de référence pour la recherche d'AAN comme elle est plus sensible pour ces AAN non identifiables que le test ANA-ELISA qui présente seulement des antigènes identifiés purifiés.

## **VI.10 Problèmes rencontrés au cours de la réalisation de pratique**

### **VI.10.1 IFI :**

- **Manipulation :**

Nous avons préparé plusieurs lames Hep-2 avec taux d'échec de 13%, parmi les problèmes :  
-Problème de lavage, soit agressif, provoquant l'éclatement des noyaux donnant un aspect faussement cytoplasmique. Ou bien un lavage insuffisant à l'issue de faux positifs.

-Problème des bains de lavage qui sont conservés à basse température si ne sont pas sortis à temps et n'acquièrent pas la température ambiante, on assiste à un phénomène de choc thermique avec éclatement des noyaux des cellules Hep-2.

-Problème d'obscurité, le conjugué est sensible à la lumière, le contact lumineux diminue la fluorescence.

- **Lecture :**

-La fluorescence diminue avec le temps. La lecture doit être réalisée dans un court délai.

- Expérimentation en matière de lecture

## VI.10.2 ELISA

- **Manipulation :**

-La réalisation des tests ELISA sont beaucoup plus facile que la technique IFI, les erreurs sont faites surtout par manque de concentration de manipulateur, par exemple remplie le même puits 2 fois ou par 2 sérums différent.

-On rencontre aussi problème de lavage, ou la présence d'une bulle d'air dans le micro-puits et le non-respect d'obscurité.

-Le majeur problème d'ELISA est la stabilité des réactifs.

- **Lecture :**

-L'intensité de coloration diminue avec le temps, ce qui donne des résultats faussement négatifs.

-Problème lié au spectrophotomètre, le manque d'entretien diminue l'efficacité de test.

## VI.11 Evaluation économique :

Test	Marque	Contenu du kit	Prix en 2017
IFI sur Hep-2	NOVA Lite	20 Lames x 12 puits	56 000 DA
ANA-ELISA	QUANTA Lite	1 plaque x 96 puits	40 000 DA

Tableau VI-9 Prix des kit ANA-ELISA et IFI Hep-2

- **Discussion :**

Le kit ANA-ELISA QUANTA Lite offre la possibilité exercé 93 tests (96puits – T. Positif – T. Négatif – cutt off) avec un prix de 40.000 DA donc le laboratoire fourni 430 DA/patient.

Le kit IFI Hep-2 NOVA Lite donne 240 puits pour 200 patients (40 puits entre T. Positif et Négatif) avec un prix de 56.000 DA (2017), ou bien 280 DA/patient.

Le Kit IFI HEP-2 offre un nombre de test plus grand que le test ELISA avec moindre cout.

## Conclusion

1. Les connectivites sont des maladies de prédominance féminine. Ils peuvent survenir à tout âge, cependant les fréquences élevées sont marquées dans la tranche d'âge allant de 21 à 50 ans.
2. La recherche d'AAN (marqueur biologique des connectivites), se réalise au niveau de laboratoire d'immunologie « Hassiba BENBOUALI » par technique ANA-ELISA suivi en cas de positivité par technique IFI sur HEp2. Notre étude a montré que la technique IFI sur HEp2 est plus performante en termes de sensibilité (96,6%) et de spécificité (82%) que la technique ELISA (sensibilité=76,6%, spécificité=81,1%).
3. Bien que le test ANA-ELISA a l'avantage d'être plus facile à réaliser, un screening initial par ce test, risque par conséquent de faire manquer un nombre considérable et inquiétant (7% dans notre étude) de patients présentant des AAN positif détectés par IFI sur HEp-2.
4. Ces patients non détectés par ANA-ELISA, selon notre étude, se révélaient positifs lors de l'identification avec présence de différentes cibles à savoir les anticorps anti-ENA6 (16 patients), anticorps anti-ADNdb (2 patients) et anticorps anti-histone (6 patients), 48% entre eux présentaient des taux faibles, alors que 52% présentaient des taux élevés. Ces sujets peuvent être donc des malades potentiels, d'où la nécessité d'un suivi périodique par mesure de prévention pour ne pas arriver aux stades de complications. De plus les connectivites se caractérisent par un retard diagnostique estimé à 3 ans dans l'étude de Kane et al. (2016), donc donner un résultat faussement négatif pour ces patients peut retarder encore plus le diagnostic et la prise en charge de ces patients.
5. La méthode de détection par IFI sur HEp-2 est de ce fait recommandée comme test de screening initial pour les AAN pour détecter le plus de patients positifs en un seul screening sans avoir recours à un deuxième, économisant ainsi le temps, le cout et donnant un résultat plus fiable.
6. Selon les recommandations de l'ACR, l'utilisation d'une méthode de screen pour les AAN autre que l'IFI sur HEp2 étant le *gold standard*, exige que le laboratoire fournisse des données sur demande, pour indiquer que le test alternatif présente une sensibilité identique ou améliorée par rapport à celle du test AAN par IFI sur HEp2. Ainsi que les laboratoires doivent spécifier les méthodes utilisées dans la détection des AAN lors du rapport de leurs résultats.

# REFERENCES

## REFERENCES

1. ChantalAndré, et al., *Mécanismes physiopathologiques de l'auto-immunité*. 2012.
2. Marie Christine Béné, Jean-Daniel Lelièvre, and J. Sibilia, *Immunopathologie*, ed. E. MASSON. 2015: Association des Collèges des enseignants d'immunologie des universités de langue française(ASSIM).
3. Goetz., J., B. Nespola., and j. sibilia., *Comment prescrire les auto-anticorps :des indications à la juste prescription* REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES, 2016(N°484).
4. Goetz and Nespola, *Le dialogue clinico-biologique en auto-immunité*. Bio Med 2015 ( 15:204-8.).
5. Lakomy., D. and J. Goetz., *Comment interpréter un résultat d'auto-anticorps? Les pièges diagnostiques*. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES, 2016(N°484).
6. Pasquali., J.-L. and J. Goetz, *Que faire en présence d'anticorps antinucléaires chez l'adulte, in Lupus érythémateux*. 2013. p. 319.
7. Chevailler, A., *LES CONNECTIVITES: LA PLACE DES ANTICORPS ANTINUCLIAIRES*. Revue Francophone des Laboratoires, 2006( N°384).
8. Emile, C., *Dosage des autoanticorps et interprétation*. OptionBio, 2017(n565-566).
9. Goetz and Chevailler, *Immunofluorescence indirecte*. GEAI l'InfoSpécial 2005: p. 2-5.
10. M. Essakalli, et al., *Biologist's role in the medical management of autoimmune diseases:Autoantibodies*. Immuno-analyse et biologie spécialisée 2012. **27**( 260—265).
11. I. Peene, et al., *Sensitivity of the HEp-2000 Substrate for the Detection of Anti-SSA/Ro60 Antibodies*.Clinical Rheumatology, 2000. **19**(291–295).
12. Magdelaine., C., C. Vigneron., and D. Degenne., *ASPECTS DES ANTICORPS ANTINUCLIAIRES SUR LES CELLULES HEp-2*. Revue Francophone des Laboratoires, juillet-aout2006(N°384).
13. COFER, *Maladies auto-immunes*, in *Université Médicale Virtuelle Francophone*. 2010-2011.
14. Gerd Burmester and A. Pezzutto, *Color Atlas Of Immunology*. 2003. 322.
15. Proust-Lemoine, E. and J.-L. Wémeau, *Syndrome Apeced ou polyendocrinopathie auto-immune de type 1*. La Presse Médicale, 2008. **Volume 37**(n° 7-8).
16. ASSIM, *Pathologies autoimmunes: aspects épidémiologiques, diagnostiques et principes du traitement*, in *Université Médicale Virtuelle Francophone*. 2010-2011.
17. Philippe Dieudé, Estibaliz Lazaro, and C. Richez, *physiopathologie du lupus érythémateux*, in *lupus érythémateux*. 2013.
18. Ramos-Casals Manuel, et al., *GOOGLE-DRIVEN SEARCH FOR BIG DATA IN AUTOIMMUNE GEOEPIDEMIOLOGY. Analysis of 394,827 patients with systemic autoimmune diseases*. Autoimmunity Reviews 2015.
19. Yinon Shapira, N. Agmon-Levin, and Y. Shoenfeld, *geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases*. nature reviews rheumatology, 2010. **86**.
20. Lerner, A., P. Jeremias, and T. Matthias, *The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing*. International Journal of Celiac Disease, 2015. **vol 3**(N°4): p. 151-155.
21. Pollard, K.M., *Autoantibodies and Autoimmunity-Molecular Mechanisms in Health and Disease*. 2006: Wiley-VCH. 608.
22. Hai Long, et al., *The Epigenetics of Autoimmunity, in translational epigenetics*. 2018. p. 1-23.
23. Denny MF, et al., *Accelerated macrophage apoptosis induces autoantibody formation and organ damage in systemic lupus erythematosus*. J Immunology, 2006. **176**(2095-104).
24. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, and R. A., *Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes*. exp med, 1994. **179**(1317-30).
25. Munoz LE, et al., *Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Lupus 2008. **17**( 371-5).
26. Fernandez-Madrid, F. and M. Mattioli, *Antinuclearantibodies (ANA) :Immunologic and clinicalsignificance*.Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1976. **6**( 83–124).
27. Meyer, O., *Manifestations cliniques et biologiques Diagnostic du lupus érythémateux, in lupus érythémateux*. 2013. p. 319.

28. HUMBEL, R.L., *histoire des anticorps antinucléaires*. GEAI info 1999. N°2: p. 1-2.
  29. Goulvestre, C., *Anticorps antinucléaires*. Presse Med, 2006. **35**(287-95).
  30. Sibilia, J., *Nouveaux concepts et nouveaux traitements dans les maladies auto immunes : les dix points d'actualité*. Revue du Rhumatisme, 2004. **71**(1114–1121).
  31. Arbuckle MR, et al., *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. Med, 2003. **349**( 1526-33).
  32. Agnès Pardon, Pierre-Alexandre Bart, and V. Aubert, *BIOMARQUEURS EN IMMUNOLOGIE GÉNÉRALE*. Rev Med Suisse, 2013. **9**.
  33. Stéphanie Petitpierre, et al., *Utilité de la recherche des autoanticorps dans la pratique quotidienne*. rev Med Suisse, 2009. **5**( 823-831).
  34. Solomon DH, et al., *Evidence-based guidelines for the use of immunologic test : Antinuclear antibody testing*. Arthritis Rheum, 2002. **47**(434-44).
  35. K. Lassoued , P. Coppo , and V. Gouilleux-Gruart, *Place des anticorps antinucléaires en pratique clinique* Réanimation, 2005. **14**: p. 651–656.
  36. Riemekasten G, et al., *A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Invest, 1998. **102**(754-63).
  37. Hello, A.-C., *LES AUTO-ANTIGÈNES ET LES AUTO-ANTICORPS*, in *immunopathologie pour le praticien*, MédecinePlus, Editor. 2007.
  38. Casiano, C.A. and F.J. Pacheco, *Cell Death and Autoimmunity*, in *autoantibodies and autoimmunity*, K.M. Pollard, Editor. 2006. p. 107-128.
  39. Lassoued, K., P. Coppo, and V. Gouilleux-Gruart, *The use of antinuclear antibodies in clinical practice*. Réanimation 2005. **14**(651–656).
  40. CHAKRAVARTHY, et al., *Structural Characterization of Histone H2A Variants*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
  41. McGinty, et al., *Nucleosome Structure and Function*. Chemical Reviews, 2015.
  42. Okamoto1, Y., et al., *A minimal CENP-A core is required for nucleation and maintenance of a functional human centromere*. THE EMBO JOURNAL, 2007. **26**(1291).
  43. Cleveland, D., Y. Mao, and K. Sullivan1, *Centromeres and kinetochores:from epigenetics to mitotic checkpoint signaling*. Cell vol, 2003: p. 407.
  44. Chyderiotis, G., A. Ebel, and L. Oger. *Diagnostic des maladies auto-immunes*. Document biomedical diagnostics 2009 [cited 2009 Mai 2009]; Source : Sanofi-Pasteur et Association française du lupus Dr J. Sibilia -Serviced de Rhumatologie et Institut d'immunologie de Strasbourg].
  45. BEN-CHETRIT, E., *THE MOLECULAR BASIS OF THE SSA/Ro ANTIGENS AND THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF THEIR AUTOANTIBODIES*. 5 ed. Vol. 32. 1993: Rheumatology. 396.
  46. Moutsopoulos, H.M. and L.V. Zerva, *Anti-Ro (SSA)/La (SSB) antibodies and Sjögren's syndrome*, in *Clinical Rheumatology*, C. as, Editor. 1990. p. 123-131.
  47. Krishna, et al., *Crystal structure of the eukaryotic DNA polymeraseprocessivity factor PCNA*. Cell, 1994(1233): p. 1243.
  48. V, W.-S., et al., *Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game*. Trends Immunol., 2011. **32**(24).
  49. Admou, B., et al., *Autoantibodies in systemic sclerosis: clinical interest and diagnosis approach*. Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 2009. **67**(3): p. 273-81.
  50. Hiepe, F., *Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus*, in *autoantibodies and autoimmunity*, K.M. Pollard, Editor. 2006. p. 247-266.
  51. Tan, E.M., *The Importance of the Autoantibody-defined Epitope*, in *autoantibodies and autoimmunity*, K.M. Pollard, Editor. 2006. p. 27-33.
  52. Humbela, R.-L., *Importance des antigènes dans les méthodes de recherche des autoanticorps*. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES, 2008. N°404: p. 7-10.
  53. Béné, M.C., et al., *Méthodes en immunologie*
- Des principes aux bonnes applications*. 2014: ELSEVIER Masson. 214.
54. FORTENFANT, F. and S. DUBUCQUOI, *Les radio-immunodosages ont-ils encore une place*

dans notre pratique quotidienne ? GEAI info, 2005. **Numero Special**: p. 7.

55. Lafont, R. *MÉTHODES PHYSIQUES DE SÉPARATION ET D'ANALYSE ET MÉTHODES DE DOSAGE DES BIOMOLÉCULES*. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES; Available from: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>.

56. Gl, F., *The early days of the antinuclear antibody story: where and how did it all start?* Ann Med Interne (Paris), 1993. **144** (154): p. 56.

57. JS, B., *Variations in the morphological patterns of «autoimmune» nuclear fluorescence*. Lancet, 1961. **1**(1203): p. 5.

58. Joëlle GOETZ, A.C., *Techniques utilisées en Auto-immunité* GEAI info, 2005. **Numero special** p. 2.

59. HUMBEL, R.L., *Stratégie d'étude des anticorps antinucléaires*. Biotribune, 2003. **7**(18): p. 9.

60. J., G., *Anticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB*. In: MEYER O, ROUQUETTE AM, YOUINOU P, editors. *Autoanticorps, marqueurs des maladies auto-immunes*. BMD, 1999(129): p. 41.

61. J, G. and O. NO, *L'automatisation des sérologies auto-immunes*. Biotribune, 2004. **9**(56): p. 8.

62. G, R., et al., *Monoclonal immunoglobulins discovery in autoantibodies screening using indirect immunofluorescence*.

. Immunol Lett, 2003. **Abstracts of the 15th European Immunology Congress (EFIS 2003)**.(246): p. 7.

63. Johanet, C. and É. Ballot, *Techniques ELISA en auto-immunité*. GEAI info, 2005. **Numero special**: p. 10.

64. RL, H., *Recherche et identification des autoanticorps*. Autoanticorps et maladies auto-immunes, 1994(27): p. 43.

65. E, E. and P. P, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*.

*Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(871): p. 4.

66. A, T., et al., *Heterogenous behavior of anti-b2-glycoprotein I antibodies onvarious commercially available enzyme immunoassay plates coated with b2-glycoprotein I*. Rheumatol, 2000. **27**(391): p. 6.

67. M, T., N. P, and S. J., *The binding of proteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies*

*(PR3-ANCA) varies in different ELISAs*. J Clin Pathol, 2004(303): p. 8.

68. G, R., et al., *Multicenter evaluation of nine commercial kits for the quantitation of anticardiolipin antibodies*. Thromb Haemost, 1995(444): p. 52.

69. N, W. and P. T, *Flow cytometry: an "old" tool for novel applications in medicalgenetics*. Clin Genet, 2001(1): p. 8.

70. DAA, V., *Multiplexed particle-based flow cytometric assays*. J Immunol Methods, 2000(243): p. 55.

71. Moalic, V., B. Mercier, and C. Ferec, *Luminex™ Technology: technical approach, applications and future prospects*. Science direct, 2004: p. 181.

72. OLSSON, N.-O., *La technologie Luminex® : application à la recherche des autoanticorps*. GEAI info, 2005. **numero special**: p. 24.

73. Kumar GLS, Sumanth & Chaudhury, Abhijit & Verma, Anju & Kalawat, Usha & BV, Ramana & Kumar B, Siddhartha. (2014). *Comparison of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with indirect immunofluorescence for detection of anti-nuclear antibody*. Journal of Clinical and Scientific Research. 3. 237-242. 10.15380/2277-5706.JCSR.14.056.

74. Invernizzi P, Miozzo M, Selmi C, Persani L, Battezzati PM, Zuin M, et al X chromosome monosomy: a common mechanism for autoimmune diseases The Journal of Immunology 2005 ; 175 : 575-8.

75. WOODRUFF EMLLEN and LAURIE O'NEILL, *Comparison of Detection with Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent assays* ; *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 40, No. 9, September 1997, pp 1612-1618 . 1997, American College of Rheumatology
76. S. Feki, F. Frikha, Y. Ben Hadj Hmida, S. Abed, M. Ben Ayed, H. Turki, J. Hachicha, S. Baklouti, Z. Bahloul, H. Masmoudi, *Prévalence et valeur diagnostique des anticorps antinucléaires de spécificité antigénique indéterminée : étude rétrospective à propos d'une série de 90 patients* ; *La Revue de médecine interne* 33 (2012) 475–481
77. B.S.Kane, S.Ndongo, A.A.Ndiaye, B.Djiba, M.Niasse, N.Diack, A.C.Ndao, B.C.Fall, S.Gning, A.Pouye : *Maladies systémiques en médecine interne « contexte africain »: aspects épidémiologiques et classificatio*. *La Revue de Médecine Interne*, Volume 37, Supplement 1, June 2016, Page A37
78. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, Kalden JR, Lahita RG, Maini RN, McDougal JS, Rothfield NF, Smeenk RJ, Takasaki Y, Wiik A, Wilson MR, Koziol JA : *Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals*. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1601-11.

# ANNEXES

TABLEAU DES ANNEXES	
ANNEXE 01	Methodology of Testing for Antinuclear Antibodies ACR
ANNEXE 02	Résumé d'un recherche similaire <i>Kumar 2014</i>
ANNEXE 03	Prospectus QUANTA Lite ANA ELISA
ANNEXE 04	Prospectus NOVA Lite® HEp-2 External EB Kits
ANNEXE 05	Appareillage & Fiche de renseignement

ANNEXE 01
-----------

## AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY

### POSITION STATEMENT

**SUBJECT:** Methodology of Testing for Antinuclear Antibodies

**PRESENTED BY:** American College of Rheumatology

**FOR DISTRIBUTION TO:** Members of the American College of Rheumatology  
 Medical Societies  
 Managed Care Organizations/Third Party Carriers  
 Laboratories  
 Other interested parties

### POSITIONS:

- 1.The ACR supports the immunofluorescence antinuclear antibody (ANA) test using Human Epithelial type 2 (HEp-2) substrate, as the gold standard for ANA testing.
- 2.Hospital and commercial laboratories using alternative bead-based multiplex platforms or other solid phase assays for detecting ANAs must provide data to ordering healthcare providers on request that the alternative assay has the same or improved sensitivity compared to IF ANA
- 3.In-house assays for detecting ANA as well as anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, etc., should be standardized according to national (e.g, CDC) and/or international (e.g., WHO, IUIS) standards.
- 4.Laboratories should specify the methods utilized for detecting ANAs when reporting their results

### BACKGROUND:

The methodology of the tests for the detection of (ANA) has changed over the years from the LE cell prep,to immunofluorescence utilizing sections of various rodent organs (e.g. rat or mouse liver or kidney, etc.) to cell lines, in particular HEp-2. HEp-2cells contain approximately 100 to 150 autoantigens. These cells are used to detect ANA by the immunofluorescence method, in which both pattern and titer can be described, and to display a variety of autoantigens not present in the multiplex ANA tests. These multiplex assays can detect only the specific auto-antibodies directed against the limited number (typically 8-10) of auto-antigens that are displayed. Researchers have seen the evolution of methodology of tests for the detection of particular ANAs (anti-DNA, Sm, RNP, Ro/SS-A, La/SS-B, etc.) as well from

immunodiffusion, complement-fixation, hemagglutination, to various solid phase immunoassays.

Over the years, numerous investigators and commercial organizations have attempted to develop solid phase immunoassays for the detection of ANA and specific ANAs, which are easier and cheaper to perform and standardize compared to immunofluorescence assays using fixed HEp-2 cells as a substrate. A review of the literature indicates that up to 35% of patients with SLE and a positive ANA by immunofluorescence (IF) were negative on solid phase assays (1-4, 6-21, 23). Recent research would indicate that the (ANA)-HEp-2 test results discriminate ANA-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases (ARDs). Many commercial laboratories and some hospital laboratories have switched their ANA screening test to solid phase immunoassays, such as a multiplex platform, for the reasons noted above, and since the latter technique can screen and process larger volumes of clinical specimens than the traditional immunofluorescence ANA test using fixed HEp-2 cells as substrate.

Various national and international organizations have also been involved in the standardization of these tests for the harmonization of laboratory results. These include World Health Organization, Centers for Disease Control, Dutch Red Cross and the International Union of Immunological Societies.

Any laboratory test, to be most useful, must maximally distinguish patients with a particular disorder from related disorders. It is understood that both commercial and hospital laboratories are interested and committed to providing the best laboratory tests for the diagnosis of rheumatic diseases. Laboratories should indicate the method used when reporting ANA results.

The immunofluorescence ANA test is the gold standard for ANA testing. When performed with a history and physical, it identifies almost all patients with systemic lupus erythematosus (sensitivity over 95%) (although the specificity of this assay is only 57% for SLE when compared to patients with related rheumatic and autoimmune disorders. In addition, the IF ANA is an important test in the evaluation of systemic sclerosis (sensitivity 85%), polymyositis/dermatomyositis (sensitivity 61%), primary Sjogren's syndrome (sensitivity 48%), juvenile idiopathic arthritis (sensitivity 57%), drug-induced lupus (sensitivity 49-100%), mixed connective tissue disease (sensitivity 100%), and autoimmune hepatitis as well as being important in monitoring and assessing prognosis in individuals with Raynaud's phenomenon. Finally, ANA testing is an important prognostic marker for uveitis in patients with juvenile inflammatory arthritis and is an essential element in determining the frequency of required ophthalmologic exams as per published guidelines. Healthcare providers should avoid ordering panels of ANA subserologies (double stranded DNA, Smith, RNP, SS-A, SS-B Scl-70, centromere) when not appropriately indicated. Instead, ordering healthcare professionals should select specific ANA subserologies based on a patient's signs and symptoms and when there is a high pretest suspicion for a specific condition.

## ANNEXE 02 :

## Comparison of enzyme linked immunosorbant assaay (ELISA) with indirectimmunofluorescence for detection of anti-nuclear antibody

*G.L.S. Sumanth Kumar, Abhijit Chaudhury, Anju Verma, Usha Kalawat, B.V. Ramana, B. Siddhartha Kumar*

Department of Microbiology, Division of Rheumatology, Department of Medicine, Sri Venkateswara Institute of Medical Sciences, Tirupati

### ABSTRACT :

**Background:** Detection of antinuclear antibody (ANA) is used as one of the diagnostic criteria for autoimmunerheumatic diseases (ARD). Both indirect immunofluorescence (IIF) and enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) methods are used for this purpose. However, there are lack of data comparing these two tests from India.

**Methods:** We prospectively studed 294 patients clinically suspected to be having ARD between April 2012 andSeptember 2013. They were tested for ANA by IIF and ELISA methods. Representative samples positive by both thetests were processed again by a line immunoassay test to detect the specific antinuclear antibodies. Considering the IIFresults as the 'gold standard', the utility of ELISA for ANA detection was analyzed.

**Results:** Of the 294 samples processed, 181 (61.5%) were from female patients. By IIF 30% of samples in males and40.3% sample in females tested positive. We found ELISA to have a poor sensitivity (45.8%) but good specificity(99.5%). The positive predictive value for ELISA were 98% and negative predictive value 76.2% respectively. Fortyfour samples positive by both IIF and ELISA were tested by Western blot to detect individual autoantibodies. Of these,only 24 samples showed the presence of one or more bands, while the remaining 20 (45.4%) were negative by lineimmunoassay. In our study anti-nuclear ribonucleoprotein/Smith was the most common ANA detected.

**Conclusions:** The poor sensitivity raises concerns regarding the practice of initial screening for ANA by ELISA.

**Key Words:**Anti nuclear antibody, ELISA, Indirect immunofluorescence, Line immunoassay

## ANNEXE 03

## Application

ANA est un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) pour la détection semi-quantitative des Anticorps anti-nucléaires (ANA) dans le sérum humain. Les résultats de la recherche des ANA peuvent être utilisés en conjonction avec les signes cliniques et d'autres tests de laboratoire pour orienter le diagnostic des connectivites comme le Lupus Erythémateux Disséminé (LED), le Syndrome de Sjögren, la sclérodermie et les connectivites mixtes. Ce test détecte dans un seul puits les ANA contre les nucléosomes (ADNdb et histones), Sm/RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, centromère et PCNA ainsi que des auto-anticorps anti-antigènes du cytoplasme d'importance diagnostique comme Jo-1, Mitochondrie M2 et Ribosome P. Des sérums positifs pour des antigènes non identifiés par la technique d'ImmunoFluorescence Indirecte (IFI) traditionnelle sur HEP-2 peuvent aussi être détectés.

## Informations concernant le test

La présence d'ANA est un des marqueurs des maladies systémiques.

Les ANA sont dépistés par IFI en utilisant comme substrat les coupes de rein-estomac de souris ou de rat ou sur HEP-2. A l'issue de cette étape, les sérums ANA positifs peuvent être typés en utilisant une technique ELISA, Western blot ou d'Immunoprécipitation.

Récemment, un mélange d'antigènes à valeur diagnostique extraits des cellules HEP-2 a été utilisé avec la technique ELISA pour détecter les ANA.

Les avantages de la technique ELISA par rapport à la technique d'IFI incluent la facilité d'utilisation, des résultats standardisés (sans variations dues ni à l'observateur ni à l'équipement) et semi-quantitatifs et la technique ELISA réduit le risque de résultats faussement positifs.

Les inconvénients de la technique ELISA par rapport à la technique IFI sont par contre le manque de sensibilité vis-à-vis des antigènes nucléaires et cytoplasmiques à ce jour non identifiés d'une part et le manque de possibilité d'observation des patterns qui font le succès de la technique IFI d'autre part. Cependant, l'utilité diagnostique d'un ANA de spécificité inconnue n'est pas claire aujourd'hui dans la mesure où de nombreuses personnes non malades sont ANA positives mais ne comportent pas d'ANA de valeur diagnostique importante.

De plus, une fois qu'une réactivité spécifique est identifiée dans un sérum, le pattern ne présente alors plus de valeur diagnostique. C'est pourquoi, la technique ELISA a une place utile en laboratoire pour la détection des ANA

## Principe du test

Des antigènes extraits de cellules HEP-2 séparément puis hautement purifiés par affinité sont fixés sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène dans des conditions qui préservent leur état natif. Ces antigènes sont: les nucléosomes (ADNdb et histones), Sm/RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, centromère, PCNA, Jo-1, Mitochondrie M2 et Ribosome P. Il a été montré récemment que la réactivité anti-nucléosomes est un marqueur sensible et précoce des LED. Les contrôles pré-dilués et les sérums de dilués patients sont ajoutés dans différents puits. Une étape d'incubation permet la liaison entre les anticorps anti-ANA présents dans le sérum et l'antigène immobilisé dans le puits. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-IgG humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les autoanticorps du patient. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage.

L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat chromogène suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Les résultats peuvent être évalués par comparaison entre la couleur du puits échantillon et celle des puits de contrôle.

## Contenu du coffret

1. Plaque de microtitration ELISA revêtue d'antigènes nucléaires et cytoplasmiques avec portoir de 12 barrettes de 8 micropuits en polystyrène sécables, dans un sachet d'aluminium avec un dessiccant
2. Contrôle Négatif pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain sans anticorps humains anti- nucléaires et cytoplasmiques, dans du tampon avec du stabilisateur
3. Contrôle ELISA ANA faiblement positif pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains anti- nucléaires et cytoplasmiques, dans du tampon avec du stabilisateur
4. Contrôle ELISA ANA fortement positif pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains anti- nucléaires et cytoplasmiques, dans du tampon avec du stabilisateur
5. Diluant d'échantillons HRP, teinté en rose, 1 flacon de 50 ml contenant du tampon Tris salin, du Tween 20, des stabilisateurs de protéines et des conservateurs
6. Tampon de lavage HRP concentré 40X – tampon Tris salin avec du Tween 20, teinté de rouge, 1 flacon de 25 ml. Consulter le paragraphe "Méthode" pour la dilution.
7. Conjugué HS HRP IgG, anticorps de chèvre anti-IgG humaines dans du tampon avec des stabilisateurs de protéines et des conservateurs, teinté en violet, 1 flacon de 10 ml
8. TMB Chromogène, avec stabilisateurs, 1 flacon de 10 ml
9. Solution d'arrêt HRP, acide sulfurique 0,344M, non teinté, 1 flacon de 10 ml

## Avertissements

1. ATTENTION : Le diluant des échantillons, les contrôles et le conjugué contiennent 0,02% de chloramphénicol, considéré comme cancérigène dans l'état de Californie.
2. Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.

3. L'azide de sodium (NaN) est utilisé comme conservateur. NaN est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.

4. Le conjugué Peroxydase HRP contient un composant chimique dilué qui est un poison corrosif, toxique en cas d'ingestion en grande quantité. Pour éviter des brûlures chimiques, il est recommandé d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux.

5. Le chromogène TMB est irritant et peut être toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et d'absorption en grande quantité. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux et toute inhalation.

6. La solution d'arrêt HRP est une solution diluée d'acide sulfurique. Éviter de l'exposer aux bases, aux métaux, aux oxydants ou tout autre composé susceptible de réagir avec les acides. L'acide sulfurique est toxique et corrosif en cas d'absorption. Éviter le contact avec la peau et les yeux pour éviter toute brûlure chimique.

7. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.

8. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

## Précautions

1. Ce test est pour un usage diagnostique in vitro.
2. Toute substitution par d'autres réactifs que ceux fournis dans le coffret entraîne des variations de résultats.
3. Un lavage incomplet ou insuffisant et une aspiration insuffisante du liquide dans les puits d'ELISA entraînent des imprécisions et un bruit de fond élevé.
4. L'automatisation, complète ou partielle, du traitement des échantillons dans ce test peut produire des différences de résultats par rapport au traitement manuel. Chaque laboratoire est responsable de la validation des procédures automatiques afin que les résultats des tests restent dans les limites acceptables.
5. Un certain nombre de facteurs influencent la performance du test : la température initiale des réactifs, la température ambiante, l'exactitude et la reproductibilité de la technique de pipetage, la qualité du lavage et de vidange des puits d'ELISA, le photomètre utilisé pour mesurer les résultats et la durée des temps d'incubation pendant le test. Il est donc recommandé de prêter attention à tous ces facteurs pour obtenir des résultats reproductibles et rigoureux.
6. Il est recommandé de suivre strictement le protocole. Chaque modification est au risque de l'utilisateur.
7. La fermeture incomplète de la pochette contenant les puits de microtitration et le dessiccant entraîne la dégradation de l'antigène et en conséquence une mauvaise précision des résultats.
8. Des valeurs faibles et inacceptables d'absorption peuvent être progressivement observées dès le deuxième prélèvement dans le même flacon de conjugué HRP. Il est donc important de suivre exactement les instructions fournies pour éviter ce risque.
9. Un nettoyage ou rinçage inapproprié des appareils et instruments pourrait provoquer une contamination chimique du conjugué HRP. Des résidus de produits chimiques courants de laboratoire comme le formol, l'eau de javel, l'éthanol ou les détergents, entraînent la dégradation progressive du conjugué HRP. Il est absolument recommandé de rincer abondamment tous les instruments et appareils après l'utilisation des détergents chimiques.

## Conditions de conservation

1. Conserver tous les réactifs du coffret entre 2-8°C. Ne pas congeler. Les réactifs sont stables jusqu'à la date limite d'utilisation dans des conditions de stockage et d'utilisation conformes.
2. Les puits non utilisés devront être remis dans l'emballage en aluminium avec le dessiccant, bien refermé et stocké à 2-8°C.
3. La solution de tampon diluée reste stable une semaine à 2-8°C.

## Echantillons

Ce test doit être réalisé avec des sérums comme échantillons. L'addition d'azide ou d'autres conservateurs aux échantillons peut affecter le bon déroulement de la procédure. Les sérums contaminés par des agents microbiens, prétraités par la chaleur ou contenant des particules visibles ne doivent pas être utilisés. Les sérums ou échantillons hémolysés ou lipémiques sont à éviter.

3

Après prélèvement, le sérum doit être séparé du culot. Le document H18-A2 du NCCLS recommande les conditions suivantes de conservation : 1) Conserver les échantillons à température ambiante pas plus de 8 heures. 2) Si le test ne peut pas être fait dans les 8 heures, conserver les échantillons à 2-8°C. 3) Si le test ne s'effectue pas dans les 48 heures ou si on doit envoyer les échantillons, les congeler à -20°C ou à plus basse température. Bien agiter les échantillons décongelés.

## Procédure

### Matériel fourni

- |   |  |
|---|--|
| 1 | Plaque microtitration ELISA ANA (12-1 x 8 puits), avec support |
| 1 | 1,2 ml Contrôle ELISA Négatif pré-dilué                        |
| 1 | 1,2 ml Contrôle ELISA faiblement positif ANA pré-dilué         |
| 1 | 1,2 ml Contrôle ELISA fortement positif ANA pré-dilué          |
| 1 | 50 ml diluant HRP pour échantillons                            |
| 1 | 25 ml tampon de lavage HRP concentré 40X                       |
| 1 | 10 ml conjugué HS HRP IgG humaines de chèvre                   |
| 1 | 10 ml substrat TMB   |
| 1 | 10 ml solution d'arrêt HRP (acide sulfurique 0,344M)           |

### Autre matériel nécessaire non fourni

Pipettes 5, 100, 200-300 et 500 µl

Cônes jetables

Tubes de 4ml pour la dilution de sérum

Eau distillée ou déionisée

Récipient de 1 litre pour le tampon de lavage HRP dilué

Lecteur ELISA avec filtre de 450nm (et 620nm pour les lectures à double longueur d'ondes)

## Méthode

### Préparation du test

1. Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26C) et bien les mélanger avant de les utiliser.

2. Diluer la totalité de la solution de lavage (25ml) avec 975 ml d'eau distillée (1/40). La solution de tampon diluée reste stable une semaine à 2-8°C. Si la totalité de la plaque de microtitration n'est pas utilisée en une seule fois, un plus petit volume de tampon sera suffisant, par exemple pour traiter 16 puits, diluer 2ml de tampon concentré dans 78ml d'eau distillée.

3. Préparer les sérums des patients en les diluant au 1/41 dans le diluant échantillon ANA HRP (10µl dans 400µl). Ne pas diluer les contrôles ELISA fortement positif, faiblement positif en ANA et négatif. Les sérums ainsi préparés doivent être utilisés dans les 8 heures qui suivent leur dilution.

NOTE : Les échantillons dilués au 1/41 dans le diluant échantillon ANA HRP peuvent aussi dans un second temps, être déposés directement ainsi préparés sur des puits HEp-2 pour confirmer la positivité ANA et déterminer le pattern. Par contre, pour titrer les échantillons positifs sur

HEp-2 utiliser le tampon PBS standard de dilution des échantillons. En effet, des dilutions autres que le 1/41 n'ont pas été évaluées dans le diluant échantillon ANA HRP.

4. La détermination de la présence ou de l'absence de la ANA en unités arbitraires nécessitent deux puits pour chacun des trois contrôles et un ou deux puits pour chacun des sérums de patients. Il est recommandé de tester les échantillons en double.

### Exécution du test

1. PORTER TOUS LES REACTIFS ET LES ECHANTILLONS À TEMPÉRATURE AMBIANTE (20-26C) AVANT DE LES UTILISER.

Placer le nombre nécessaire de micro puits ou de barrettes sur le portoir.

Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le dessiccant, fermer hermétiquement pour éviter toute condensation de vapeur d'eau.

2. Distribuer 100 µl de chacun des contrôles ELISA fortement, faiblement positifs en ANA et négatif pré-dilués et de sérums des dilués patients dans les puits. Recouvrir les barrettes et laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Le temps d'incubation commence après l'ajout du dernier échantillon.

3. Lavage : aspirer le contenu de tous les puits. Ajouter 200-300µl de tampon dilué dans tous les puits et l'aspirer ensuite complètement. Répéter cette opération deux fois supplémentaires pour un total de trois lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Pour l'aspiration, maintenir la même séquence que celle utilisée lors de la distribution des échantillons.

4. Distribuer 100 µl de conjugué HS HRP IgG dans chaque puits. Le conjugué doit être prélevé du flacon dans des conditions aseptiques. Prélever en une seule fois la quantité de conjugué nécessaire à la réalisation de la série. POUR EVITER LE RISQUE DE CONTAMINATION, NE JAMAIS REMETTRE LE RESTE DU CONJUGUE NON UTILISE DANS LE FLACON.

Recouvrir les barrettes et incuber pendant 30 minutes à température ambiante, comme décrit à l'étape 2.

5. Lavage : Répéter la procédure décrite à l'étape 3.

6. Distribuer 100 µl de chromogène TMB dans chaque puits et laisser incuber à l'obscurité 30 minutes à température ambiante.

7. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt HRP dans chaque puits. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du chromogène TMB. Tapoter délicatement les plaques pour bien mélanger le contenu des puits.

8. Lire la densité optique (DO) de chaque puits à 450nm dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction. Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence peut être 620nm

### Calcul des résultats

Déterminer d'abord la valeur moyenne des duplicatas. La réactivité de chaque échantillon est calculée en divisant la DO moyenne de l'échantillon par la DO moyenne du contrôle faible et multiplier le résultat obtenu par la valeur (en unités) affectée au contrôle faible.

La valeur en unités est indiquée sur l'étiquette du flacon de contrôle ELISA positif faible en ANA.

$$\text{Valeur de l'échantillon} = \frac{\text{DO de l'échantillon}}{\text{DO du contrôle faible}} \times \text{valeur du contrôle faible}$$

La réaction n'évolue pas de manière linéaire en fonction de la quantité d'anticorps présents dans le sérum.

L'augmentation et la diminution de la concentration d'anticorps se traduisent par une augmentation ou une diminution de réactivité correspondante mais ces modifications du signal ne sont pas proportionnelles (par exemple un doublement de la quantité d'anticorps ne fera pas doubler le signal). Pour une évaluation quantitative rigoureuse des anticorps du patient, il faudra réaliser des dilutions sériées du sérum. Dans ce cas, la dernière dilution du sérum qui donne encore un signal positif sera considéré comme étant le titre en anticorps du patient.

## ANNEXE 04

## Application

Ces produits sont destinés à la recherche d'autoanticorps dirigés contre les antigènes nucléaires par immunofluorescence indirecte sur lame. Ils apportent une aide au diagnostic et au traitement lors de lupus érythémateux disséminé (LED), de syndrome de Sjögren, de polyarthrite rhumatoïde et d'autres connectivites.

## Informations concernant le test

Sous le terme anticorps anti-nucléaires (ANA) on regroupe une variété d'autoanticorps dirigés contre les constituants des noyaux cellulaires incluant l'ADN, l'ARN, et d'autres protéines nucléaires. Ces ANA sont très fréquemment mis en évidence chez les patients atteints de maladies rhumatoïdes, de connectivites et particulièrement dans les cas de LED. Il existe une corrélation étroite entre la présence d'ANA et LED. Cependant, des sérums de patients atteints d'autres connectivites telles que l'arthrite rhumatoïde, les sclérodermies ou les dermatomyosites peuvent présenter des anticorps anti-nucléaires. Des titres faibles peuvent être rencontrés dans d'autres stades de maladies. Les ANA tendent à apparaître chez les sujets sains âgés. L'immunofluorescence indirecte est la méthode de choix pour mettre en évidence les ANA circulants. Par ailleurs, il est recommandé de titrer les échantillons positifs, et de faire des investigations complémentaires telles que la recherche d'autoanticorps anti-ADN double brin et la mise en évidence d'antigènes nucléaires solubles.

Auparavant, les ANA étaient mis en évidence sur des coupes de foie de rat puis en utilisant différentes lignées cellulaires. Les cellules HEp-2 sont des cellules épithéliales. Elles sont caractérisées par des noyaux de très grande taille. Leur utilisation présente plusieurs avantages : c'est un substrat antigénique standardisé présentant peu de variation d'un lot à l'autre, ces cellules de grande taille permettent une meilleure visualisation et donc une meilleure sensibilité et les nombreuses cellules en division, permettent de détecter des antigènes qui ne sont pas exprimés par les cellules au repos

## Principe du test

Ce coffret fait appel à une technique d'immunofluorescence indirecte. Les sérums de patients et les contrôles sont incubés en présence de cellules HEp-2. Les anticorps non spécifiques sont éliminés par lavage. Un marquage fluorescent permet de révéler les autoanticorps spécifiques.

La lecture des lames s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence. La positivité des échantillons se traduit par un marquage fluorescent de certaines régions des cellules HEp-2 sur lesquelles sont accrochées les autoanticorps.

## Contenu du coffret

1. Lames HEp-2 ANA substrat ; 12 puits/lame ou 6 puits/lame
2. Sérum contrôle positif donnant un aspect homogène (3+). Il est fourni prédilué et contient 0,09% d'azide de sodium.
3. Sérum contrôle positif donnant un aspect centromère (3+). Il est fourni prédilué et contient 0,09% d'azide de sodium.
4. Sérum contrôle négatif, universellement négatif pour tous les autoanticorps. Il est fourni prédilué et contient 0,09% d'azide de sodium.
5. Conjugué FITC IgG (H+L), à la fluorescéine. Il est fourni prédilué et contient 0,09% d'azide de sodium.
6. Bleu d'Evans, solution à 1%.
7. Tampon PBS II. Solution liquide 40 fois concentrée.
8. Milieu de montage, contenant un agent «anti-fading»
9. Lames

## Avertissements

### / Précautions

Ce test est pour un usage diagnostique in vitro.

Ce réactif doit être utilisé par un personnel formé. Il est recommandé de suivre scrupuleusement le protocole. Tous les sérums des donneurs humains (coffrets seulement) ont été soumis aux tests des hépatites B et C et de l'HIV 1 et HIV 2 et se sont avérés négatifs. Toutefois, ces tests ne peuvent garantir l'absence totale d'agents infectieux. Tous les échantillons doivent donc être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés par un personnel formé. Certains composants des coffrets contiennent 0,09% d'azide de sodium comme conservateur. Il est donc nécessaire de les manipuler avec précaution. Ne pas ingérer ou mettre en contact avec la peau ou les muqueuses. En cas de contact, laver à grande eau et consulter un médecin.

Des azides de métaux explosifs peuvent se former avec le cuivre et le plomb. Laver à grande eau les récipients ayant contenu ces réactifs afin d'éviter la formation de azides.

## Conditions de conservation

Les coffrets non ouverts doivent être stockés à 2-8°C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. NE PAS

CONGELER. Lorsque les lames sont sorties de leur étui, les utiliser immédiatement. Le tampon dilué peut être stocké plus d'un mois à 2-8°C. Le conjugué de fluorescéine doit être conservé à l'obscurité et à 2-8°C. Tous les autres réactifs peuvent être stockés à 2-8°C.

## Echantillons

Les échantillons doivent être prélevés de façon stérile par ponction veineuse. Laisser le sang coaguler à température ambiante puis séparer le sérum du caillot dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les sérums peuvent être conservés à 2-8°C pendant 7 jours avant les tests, ou aliquotés et congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue.

Les congélations et décongélations successives peuvent donner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Ramener les sérums à température ambiante avant les tests. Il est recommandé d'utiliser des sérums non lipidiques, non hémolysés et non contaminés par des bactéries afin d'éviter des titres réduits ou de la fluorescence peu nette.

## Procédure

### Matériel Fourni

- 10 HEp-2 ANA Substrate Slide (6-well)(10 lames de 6 puits recouverts de cellules HEp-2ANA)
- 1 1mL Homo. Ptn. (use w/Conj. 504070 or 504088)(contrôle positif prêt à l'emploi-Homo. Ptn. (utiliser avecConj./504070ou 504088)
- 1 1mL Centromere Positive Control(contrôle positif prêt à l'emploi-centromère)
- 1 1mL IFA System Negative Control(contrôle négatif prêt à l'emploi)
- 1 7mL FITC IgG (H+L) HEp Conjugatefluorescein)(conjugué de fluorescéine FITC-IgG(H+L)HEp)
- 1 3mL 1% Evans BlueCounterstain(solution de Bleu d'Evans à 1%)
- 2 25mL PBS IIconcentrate(solution 40x de PBS II)
- 1 3mL PVA Mounting Medium(milieu de montage)
- 1 10 Coverslips(lamelles)
- 20 HEp-2 ANA Substrate slides (12-well)(20 lames de 12 puits recouverts de cellules HEp-2ANA)
- 1 1mL Homo. Ptn. (use w/Conj. 504070 or 504088)(contrôle positif prêt à l'emploi-Homo. Ptn.(utiliser avecConj./504070ou 504088)
- 1 1mL Centromere Positive Control(contrôle positif prêt à l'emploi-centromère)
- 1 1mL IFA System Negative Control(contrôle négatif prêt à l'emploi)
- 1 15mL FITC IgG (H+L) HEp Conjugate(fluorescein)(conjugué de fluorescéine FITC-IgG(H+L) HEp)
- 1 3mL 1% Evans BlueCounterstain(solution de Bleu d'Evans à 1%)
- 2 25mL PBS IIconcentrate(solution 40x de PBS II)
- 1 10mL PVA Mounting Medium(milieu de montage)
- 1 20 Coverslips(lamelles)

### Autre matériel nécessaire non fourni

- 1.Eau distillée ou déionisée pour diluer le PBS II concentré.
- 2.Un flacon pour contenir le PBS II dilué et pissette pour les lavages au PBS II.
- 3.Micropipettes pour le dépôt des échantillons.
- 4.Chambre humide pour les étapes d'incubation.
- 5.Microscope à fluorescence.

Si seules les lames sont fournies, les matériaux suivants peuvent être obtenus auprès de INOVA: contrôle positif Homo.Ptn. (utiliser avecConj./504070ou 504088)(504090), contrôle positif centromère (508184), contrôle négatif (508186), conjugué de fluorescéine anti-IgG (H+L) humaines,(réf. 504088, 504070, prédilué et prêt à l'emploi, ou réf. 504032 (à diluer entre 1/50 et 1/200), PBS II(508998), Bleu d'Evans (504049, optionnel), milieu de montage (504046, 504046),lamelles.

## Exécution du test

### Contrôle de qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent être déposés lors de chaque série.

- 1.Milieu de montage : Sortir le milieu de montage du réfrigérateur pour qu'il atteigne la température ambiante (18-28°C) avant d'être utilisé.
- 2.Diluer le PBS II concentré. Diluer le PBS II dans de l'eau distillée ou déionisée (1 volume de PBS II pour 39 volumes d'eau) et mélanger. Ne diluer que le volume nécessaire à la manipulation. Le PBS II est utilisé pour diluer les échantillons et comme tampon de lavage.
- 3.Dilution des échantillons.Pour le dépistage :diluer les échantillons au 1/40 (mettre 25µL de sérum dans 975µL de PBS II dilué).Pour la titration :faire une gamme de dilution du sérum en PBS II(1/40,

1/80, 1/160, 1/320, 1/640, etc.) Ex: Prendre 500µL de la dilution au 1/40 et ajouter 500µL de PBS II pour obtenir une dilution au 1/80. Continuer les dilutions en cascade pour obtenir les dilutions suivantes.

4. Lames. Les ramener à température ambiante (18-28°C) pendant 30 minutes avant de les sortir de leur emballage. Les marquer puis les déposer dans la chambre humide avant le dépôt des contrôles positifs et négatifs (1 goutte) dans les puits 1, 2 et 3 respectivement. Déposer 25µL d'échantillons dilués dans les autres puits.

5. Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide ambiante (18-28°C). (Des feuilles d'essuie-tout imbibées d'eau maintiendront le degré d'humidité nécessaire.)

6. Lavage. Sortir les lames de la chambre humide et les rincer rapidement à l'aide d'une pissette contenant le tampon PBS II. Placez les lames dans une cuvette de Coplin contenant du PBS II dilué ou sur un portoir immergé dans du PBS II pendant 5 minutes maximum.

7. Conjugué fluorescent. Eliminer l'excès de PBS II. Remettre les lames en chambre humide et couvrir immédiatement chaque puits avec une goutte de conjugué fluorescent.

**NE PAS LAISSER LES PUIITS A L'AIR PENDANT PLUS DE 15 SECONDES. LE DESSECHEMENT DES CELLULES ENTRAINE UNE ALTERATION DU SUBSTRAT.**

8. Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C). Recouvrir la chambre humide de papier pour éviter l'exposition à la lumière.

9. Lavage. Procéder comme dans la section 6. Il est possible d'ajouter 2 à 3 gouttes de Bleu d'Evans à 1% pour 100mL de PBS II. Ceci permettra une contre coloration.

10. Montage des lames. Sortir les lames une à une du PBS II. Sécher rapidement le pourtour des puits puis déposer une goutte de milieu de montage dans chaque puits. Déposer la lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Ne pas essayer d'éliminer les bulles d'air éventuellement apparues. Essuyer l'excès de milieu de montage.

11. Lecture des lames.

La lecture se fait à l'aide d'un microscope fluorescent le plus rapidement possible. Cependant il est possible de les stocker une semaine à 2-8°C sans affecter l'intensité de la fluorescence.

## Contrôle de qualité

Le contrôle homogène du coffret doit donner une fluorescence verte homogène du noyau (3+). Le contrôle centromère du coffret (3+) doit montrer un aspect moucheté fin au niveau de la plaque équatoriale des cellules en mitose (habituellement multiple de 46). Le contrôle négatif peut présenter un très léger bruit de fond vert pâle sur toutes les cellules HEp-2, mais en aucun cas une fluorescence franche. Si les puits de contrôle ne correspondent pas à la description ci-dessus, le test doit être considéré comme invalide et il est conseillé de le répéter.

NB: Si le Bleu d'Evans est utilisé comme contre-colorant, le contrôle négatif donnera une fluorescence diffuse de couleur orangée. Pour les contrôles positifs, le noyau sera marqué de vert alors que les parties de la cellule non marquées seront orangées.

## Interprétation des résultats

Réaction négative.

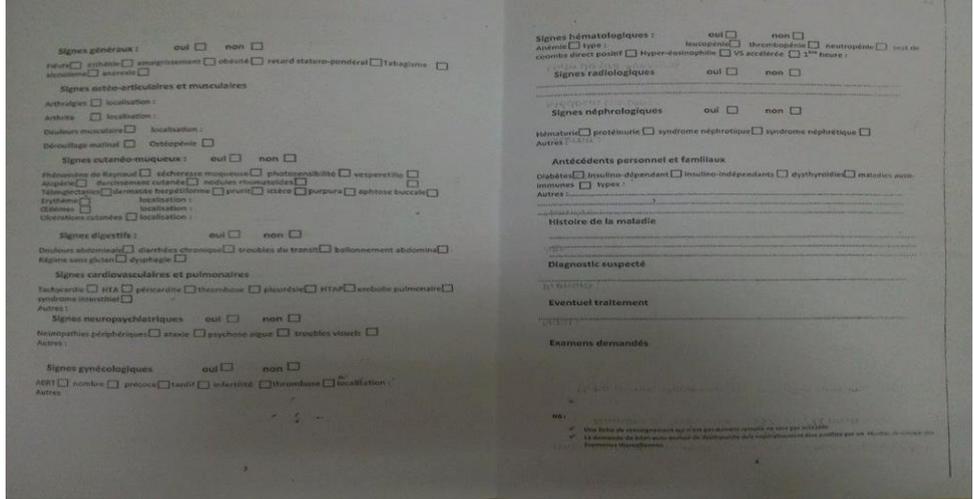
Un échantillon est considéré négatif si le marquage nucléaire est équivalent ou inférieur à celui obtenu avec le contrôle négatif.

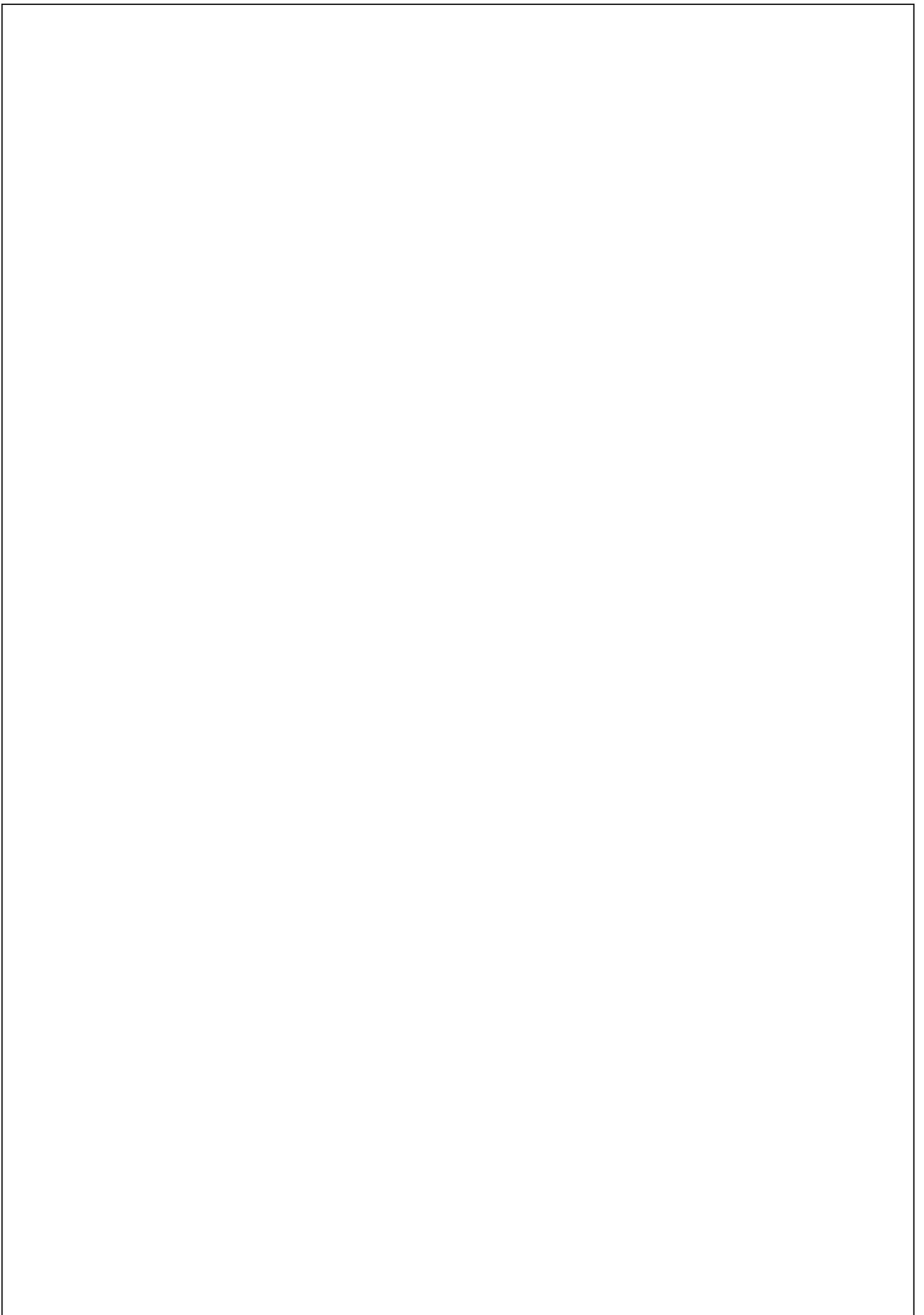
Réaction positive.

Un échantillon est considéré positif lorsque le marquage nucléaire est supérieur à celui du contrôle négatif et que l'aspect est clairement visible sur la plupart des cellules HEp-2. Les contrôles positifs fournis dans les coffrets sont 3+.

Les différents aspects observés dépendent du type et de la quantité des autoanticorps présents dans l'échantillon.

ANNEXE 05

<p style="text-align: center;"><b>Sérums à tester</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Microscope à fluorescence marque JENAMED 2</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Embouts – Tubes secs</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Congélateur -80°C marque Jouan</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Micro pipettes</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Centrifugeuse marque Jouan CR3i multifiction</b></p> 
<p><b>Fiche de renseignement</b></p>	
 <p>The form includes sections for:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Signes généraux:</b> fever, weight loss, edema, stunted growth, tachycardia.</li> <li><b>Signes ortho-articulaires et musculaires:</b> arthralgia, arthritis, muscle pain, joint pain, osteoporosis.</li> <li><b>Signes cutanéo-muqueux:</b> Raynaud's phenomenon, oral ulcers, photosensitivity, vasculitis, alopecia, nail changes, purpura, aphthous ulcers, dry eyes, dry mouth.</li> <li><b>Signes digestifs:</b> abdominal pain, chronic diarrhea, bloating, weight loss, dysphagia.</li> <li><b>Signes cardiovasculaires et pulmonaires:</b> tachycardia, hypertension, pericarditis, myocarditis, pleuritis, HFrEF, embolic pulmonary disease, intestinal syndrome.</li> <li><b>Signes neuropsychiatriques:</b> peripheral neuropathy, ataxia, acute psychosis, visual disturbances.</li> <li><b>Signes gynécologiques:</b> amenorrhea, irregular periods, infertility, thrombosis.</li> <li><b>Signes hématologiques:</b> anemia, leukopenia, thrombocytopenia, neutropenia, iron deficiency, hyper-eosinophilia, vasculitis, splenomegaly.</li> <li><b>Signes radiologiques:</b> (blank for X-ray results).</li> <li><b>Signes néphrologiques:</b> hematuria, proteinuria, nephrotic syndrome, nephritic syndrome.</li> <li><b>Antécédents personnels et familiaux:</b> diabetes (insulin-dependent/independent), thyroid disease, autoimmune diseases.</li> <li><b>Histoire de la maladie:</b> (blank for clinical history).</li> <li><b>Diagnostic suspecté:</b> (blank for suspected diagnosis).</li> <li><b>Eventuel traitement:</b> (blank for treatment).</li> <li><b>Examens demandés:</b> (blank for requested tests).</li> </ul>	



## **Résumé :**

Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement de système immunitaire aboutir à attaquer les constituants de soi. Peuvent être restreint à un organes spécifique, comme elles peuvent attaquer plusieurs organes et/ou tissus de l'organisme d'où l'appellation maladie de système.

La révélation biologique des MAI se fait par recherche des auto-anticorps qui sont impliqués à ces maladies. Aujourd'hui plusieurs auto-anticorps et leurs cibles antigéniques sont identifiés. Cette valeur biologique a poussé les chercheurs à développer nombre de techniques pour dépister ces auto-anticorps.

L'objectif de ce travail est de comparer entre la technique IFI et la technique ELISA dans la recherche des auto-anticorps antinucléaire « AAN ». Nous avons réalisé une étude prospective comparative sur 348 patients suspectés d'avoir une MAI, 120 d'eux jugés AAN+ d'après plusieurs tests immunologiques. La technique ELISA a détecté 92 sujets positifs de 120 et marqué 213 sujets négatifs dont 185 sont des vrais négatifs. La technique IFI a noté 116 patients vrais positifs, et 187 patients négatifs de 228 sujets AAN-.

Nos résultats montrent que dans la recherche des auto-anticorps antinucléaire la technique immunofluorescence indirecte est plus fiable et efficace que la technique ELISA avec une supériorité en sensibilité et spécificité de teste.

**Mots clés :** Auto-anticorps antinucléaire, étude comparative, immunofluorescence indirecte, immunoenzymatique ELISA, sensibilité, spécificité.

## **Abstract:**

Autoimmune diseases result from an immune system dysfunction resulting in attacking the constituents of oneself. Can be restricted to a specific organ, as they can attack multiple organs and/or tissues of the body hence the term system disease.

The biological revelation of AID is done by research of autoantibodies that are involved in these diseases. Today several autoantibodies and their antigenic target are identified. This biological value has prompted researchers to develop numerous techniques to screen for these autoantibodies.

The objective of this work is to compare the IIF technique and the ELISA technique in the search for antinuclear autoantibodies "ANA". We performed a prospective comparative study of 348 patients suspected of having an AID, 120 of whom were judged ANA+ according to several immunological tests. The ELISA technique detected 92 positives of 120 and scored 213 negative subjects of whom 185 were true negatives. The IIF technique noted 116 true positive patients, and 187 negative patients of 228 ANA- subjects.

Our results show that in the search for antinuclear autoantibodies the indirect immunofluorescence technique is more reliable and efficient than the ELISA technique with a superiority in sensitivity and specificity of tests.

**Key words:** Antinuclear autoantibody, comparative study, indirect immunofluorescence, enzyme immunoassay ELISA, sensitivity, specificity.