



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyse protéomique et santé

Intitulé :

La détection des auto-anticorps antinucléaires dans les maladies auto-immunes systémiques

Présenté et soutenu par :

Le : 01/07/2015

BOUGAADA FATIMA

BOUSSAID MERIEM

Jury d'évaluation :

Président du jury : NECIB. Y (Professeur - UFM Constantine).

Encadreur : MECHATTI. C (Maitre assistante - UFM Constantine).

Co-encadreur : DAFRI. A (Maitre assistante - UFM Constantine).

Examinatrice : EL OUAR. I (Maître de conférences - UFM Constantine).

Année universitaire 2014 – 2015

Remerciement

En premier lieu, on tien à remercier notre Dieu qui nous donner la force, la santé et la volonté pour accomplir ce travail.

Je tiens à remercier mon encadreur de thèse Mme MACHATI Chahineze pour la confiance qu'elle nous a accordé en acceptant d'encadrer ce travail.

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

Mme EL OUAR Ibtissem est vivement remerciée d'avoir examiné ce travail, faire partie de ce jury et enrichir le débat scientifique.

J'exprime, aussi mademoiselle DAFFRI Amel et mes sincères remerciements aux enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie

Mes sincères remerciements vont aussi aux médecins chefs du service d'immunologie de l'hôpital militaire : Dr BOUAB , Dr HOUAME, Dr MILOUDI, mlle Sawssan pour les informations utiles dans notre travail et pour votre disponibilité.

Merci

Dédicace

Je tenon en premier lieu à remercier « dieu » le tout puissant de nous avoir donné la force, la santé, volonté achever, et patience pour mener à bien ce travail.

A mes très chers parents sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et bénédictions durant toute ma vie et de me soutenir tout au long de mes études que dieux les gardent en bonne santé.

A mes frères Toufic, Abdel aali, Fares ,Brahim ,Haroun, qui m'ont soutenue et encourager . Je leurs souhaite tout le bonheur du monde.

A ma grande famille surtout à mes oncles , mes belles sœurs, mes nièces Aridj et Tesnime, ma grande mère.

A mon très chère binôme et amie fidèle « fatima » qui m'a soutenu j'ai partagé des moments inoubliables pendant et dehors du travail.

A mes chères amis C Sabrina, B Fatima, H Kanza, K Hadjer, G Wassila.

Je le dédie aussi à mes adorables amies et collègues avec qui j'ai partagé les meilleurs moments dans l'université de Constantine et de center universitaire de Mila et à toutes les personnes que j'aime.

Je dédie ce travaille à mon encadreur mademoiselle MECHATI Chahinaise, à mes enseignants a tout qui m'ont aide a tracé le chemin de réussite.

Boussaid Meriem

Dédicace

Au terme de ce travail je remercie

Mon dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage la santé et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles.

A mes très chers parents Qui m'ont toujours aidé dans ma vie et qui n'ont cessé de m'encourager et de me soutenir tout au long de mes études, Je leur souhaite tout le bonheur et la santé

A mes très chères sœurs Besma et Marwa son oubliée mes frère Hicham, Ramy je leurs souhaite tout le bonheur du monde.

A ma grande famille surtout ma grande mère, mon grand père et les petits Monib et Yahia Daas.

Aussi mes cousines Meriem, Imene, Racha et Rania.

A mes amies Asma bouteldja, Rima, Sara, Hassiba, Meriem, Sabrina, fatima, Karima, Kenza, et lamia.

Je le dédie Hakim, Moussa et Mohamed Amine Pour les encourager à moi.

Aussi a mes adorables amies et collègues avec qui j'ai partagé les meilleurs moments dans l'université de Constantine et de center universitaire de Mila.

Je dédie ce travaille a mon encadreur "Machate Shahinez", a mes enseignant a tout qui m'ont aide a tracé le chemin de réussite.

Bougaada Fatima

Sommaire

Introduction

Synthèse bibliographique

I. L'auto-immunité.....	02
I.1. Définition du concept d'auto-immunité.....	02
I.1.1. Auto-immunité physiologique.....	02
I.1.2. Auto-immunité pathologique.....	02
I.2. L'épidémiologie des maladies auto-immunes.....	03
I.3. Les facteurs de risque	03
I.3.1. Sexe et l'âge	03
I.3.2. Facteur génétique	04
I.3.3. Facteurs environnementaux.....	04
I.3.4. Rôle des médicaments	04
I.3.5. Le stress	04
I.4. Mécanismes de défense	05
I.4.1. La tolérance centrale	05
I.4.2. La tolérance périphérique	06
I.5. Mécanisme de l'auto-immunité	07
I.6. Mécanismes lésionnels des maladies auto-immunes	07
I.7. Classification des maladies auto-immunes	08
I.7.1. Les maladies auto-immunes spécifiques d'organes.....	08
I.7.1.1. Diabète de type 1	08
I.7.1.2. Thyroïdites auto-immunes	08
I.7.1.3. Hépatite auto-immune	08
I.7.1.4. La myasthénie	09
I.7.2. Les maladies auto-immunes non spécifiques d'organes.....	09
I.7.2.1. Lupus érythémateux systémique	09
I.7.2.2. Le syndrome de Gougerot-Sjögren	09
I.7.2.3. Sclérodermie	10
I.7.2.4. La connectivite mixte	10
II. Les marqueurs des maladies auto-immunes	11
II.1. Le rapport entre les auto-anticorps naturels et pathologiques	11

II.2. Les auto-anticorps antinucléaires (ANA).....	12
II.2.1. Anti-DNA natif	13
II.2.2. Antihistones	13
II.2.3. Anti-nucléosome	14
II.2.4. Anti-Smith (anti-Sm)	14
II.2.5. Anti-Ro/SSA et anti-La/SSB	14
II.2.6. Anti-RNP	14
II.2.7. Anti-Scl-70	15
II.2.8. Anti-centromère	15
II.3. Le rôle des auto-anticorps	15
III. La recherche des auto-anticorps	16
III.1. Principe de l'immunofluorescence indirecte	17
III.2. Le tests Immunodot	19
III.3. DNA <i>Crithidia luciliae</i>	19
IV. L'intérêt pratique des anticorps antinucléaires	20

Partie pratique

Méthodologie.....	22
Résultats et discussions	33
Conclusion	39
Référence	
Résumé	

Liste des figures

Figure 1: la réponse immunitaire (activation des LcT par les DC et coopération LcT et LcB)	06
Figure 2: les auto-anticorps antinucléaires dans les principales maladies auto-immunes systémiques	13
Figure3: la recherche d'ANA	17
Figure 4: Anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués à la fluorescéine.....	17
Figure5: Les principaux aspects de fluorescence	18
Figure 6: Détection des anticorps anti-ANS par immunodot	19
Figure 7: Aspect homogène de DNAn	20
Figure 8: Les étapes de l'immunofluorescence indirect	23
Figure9: Les échantillons dans les microplaques	24
Figure 10: Incubation des échantillons.....	24
Figure 11: premier lavage de la microplaque après incubation.....	25
Figure12: Le conjugué enzymatique sur microplaque.....	25
Figure 13: Incubation des échantillons.....	25
Figure 14: Lavage de microplaque avec le bleu de Vence.....	26
Figure 15: Lavage de microplaque par PBS.....	26
Figure 16: séchage des microplaques.....	26
Figure 17: Mettre l'huile de montage.....	27
Figure 28: Analyse des lames par microscope à fluorescence	27
Figure 19: les aspects de la fluorescence.....	28
Figure 20: mettre d'échantillon de sérum dilué et bandelette.....	29
Figure 21: Incubation de la bandelette et du conjugué enzymatique dilué	29
Figure 22: Incubation de bond lette avec substrat.....	30
Figure 23: Révélation de l'immunodot.....	30
Figure 24: Aspect homogène de DNAn.....	32
Figure 25: Répartition des patients selon le sexe.....	33
Figure 26: Répartition des patients selon la tranche d'âge.....	33
Figure 27: répartition des patients selon les signes cliniques.....	34
Figure 28: Répartition de patients selon le type de la maladie.....	35
Figure 29: répartition de l'aspect des ANA	36

Figure 30: résultats du bilan immunologique selon la présence des ANA dans les maladies systémique.....37

Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison des maladies auto-immunes spécifiques d'organes et non spécifiques d'organe	11
Tableau 2: Principaux anticorps évoqués en fonction de l'aspect sur cellules Hep2000	18
Tableau 3: Association clinique des principaux ANA	21

Liste des abréviations

ACA	: Anticorps Anti-Centromère.
Ac	: Anticorps.
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique.
ADNn	: Acide DésoxyriboNucléique natif.
Ag	: Antigène.
AIRE	: Auto immune régulateur.
ANA	: Anticorps antinucléaire.
Anti-Jo-1	: Anticorps anti aminoacyl-t-RNA-synthétases.
Anti-RNP	: Anticorps anti-nucléo protéine.
Anti-Ro/SSA	: Anti anticorps ribonucléoprotéique nucléaires Solubles A.
Anti-Scl-70	: Antitopoisomérase I.
Anti-Sm	: Anti-Smith.
ARN	: Acide Ribonucléique.
CENP	: Protéines des centromères.
CMH	: Complexe majeur d'histocompatibilité.
CREST	: <ul style="list-style-type: none">• des Calcifications sous cutanées = C• un syndrome de Raynaud = R• des anomalies Œsophagiennes (troubles de la motilité, reflux) = E• une Sclérodactylie. = S• des Télangiectasies. = T
CTD	: Connective Tissue Diseases.
DNMTs	: ADN méthyltransfirase.

DsADN	: Acide desoxyribonucleique double brin.
DID	: Diabète insulino-dépendant.
ENA	: Ac anti antigènes nucléaires solubles.
Erk	: Extracellular signal-Regulated Kinase.
FAN	: Facteur Antinucléaire.
FITC	: Isothiocyanate de fluorescéine.
GC	: Glucocorticoïdes.
HLA	: human leukocyte antigen.
HAI	: Hépatite Auto-Immune.
H	: Histones.
Hep2	: Human epithelial cell line type 2.
Hep2000	: Human epithelial cell line type 2000.
HHS	: Hypothalamo-Hypophyso- Surrénalien.
HMRUC	: Hôpital Militaire Régional Universitaire Constantine.
IFI	: Immunofluorescence indirect.
IgG	: Immunoglobuline G.
IL-2	: Interleukine 2.
La-SSB	: Peptide sicca syndrome B.
LB	: Lymphocytes B.
LED	: Lupus Erythémateux Disséminé.
LES	: Lupus Erythémateux Systémique.
LT	: Lymphocyte T.
MAI	: Maladie Auto Immune.

MG	: Myasthénie gravis.
PBS	: Tampon phosphate salin.
PE	: phycoérythrine.
PVC	: Chlorure de vinyle.
RACH	: Récepteur a l'acétylcholine.
RNP	: Ribonucléoprotéine.
Ro-SSA	: Petits acides ribonucléiques brandissent les peptides sicca syndrome A.
SGS	: Syndrome de Gougerot-Sjögren.
ssADN	: Acide desoxyrubonucleique simple brin.
snRNP	: Small nuclear ribonuclear protein.
ScS	: Systémique Sclérose spécifique.
Th1	: Lymphocyte helper 1.
Th2	: Lymphocyte helper 2.
Th17	: Lymphocyte helper 17.
Treg	: T-regulatory.
UV	: Ultra violet

Synthèse

Bibliographique

Introduction

Introduction

Les maladies auto-immunes (MAI) sont dues à une hyperactivité du système immunitaire à l'encontre de substances ou de tissus qui sont normalement présents dans l'organisme, en y provoquant ainsi des dommages structurels ou fonctionnels.

Les maladies auto-immunes touchent environ 5% de la population dans les pays occidentaux (Subra. J, 2004).

Elles représentent la troisième Cause de mortalité dans les pays industrialisés, derrière le cancer et les maladies cardiovasculaires.

Les maladies auto-immunes sont d'origine multifactorielle. La survenue MAI résulterait de l'interaction entre des facteurs des environnementaux et des traits génétiques de susceptibilité, qui pris isolément ne sont ni nécessaires ni suffisants pour induire une MAI (Benveniste. O et al, 2012).

Le but de notre étude est de déterminer la stratégie utilisé au cours de la recherche des anticorps antinucléaires au sein du Laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire Constantine (HMRUC), pour démontrer leur intérêt dans le diagnostic des maladies auto-immune systémique.

I. L'auto-immunité

I.1. Définition d'auto-immunité

L'auto-immunité est la rupture des mécanismes de défense qui conduit à l'action pathogène du système immunitaire vis-à-vis des constituants naturels de l'organisme et à l'apparition d'une maladie dite auto-immune (MAI), qui peut être défini par l'activation du système immunitaire du patient contre ses propres antigènes (Ag) (Bonnotte et *al*, 2004).

Les maladies auto-immunes sont d'origine multifactorielle. En effet, la prédisposition à ces maladies repose le plus souvent à la fois sur des facteurs propres à l'individu (facteurs génétiques) et des facteurs d'environnement (Abid et *al*, 2006).

I.1.1. Auto-immunité physiologique

L'activation et l'expression des lymphocytes T et des lymphocytes B sont étroitement contrôlées dans les conditions physiologiques. C'est la défaillance des mécanismes de contrôle qui est à l'origine de la survenue de manifestations auto-immunes. Dans un premier temps, il faut distinguer l'immunité innée, la première ligne de défense de l'organisme, de l'immunité adaptative, dont les acteurs sont les LB et les LT. Ensuite successivement les mécanismes pouvant contribuer à la survenue de pathologies auto-immunes, qu'il s'agisse d'un défaut de contrôle de la réponse immunitaire humorale ou cellulaire (Bonnotte et *al*, 2004).

I.1.2. Auto-immunité pathologique

L'auto-immunité est physiologique, mais le système de régulation de cette auto-immunité peut être défaillant. Il apparaît alors une auto-immunité pathologique, auto agressive, qui va aboutir au déclenchement d'une maladie auto-immune, soit par la prolifération de L B auto agressifs, soit par la prolifération de LT auto agressifs de forte affinité. Ces maladies auto-immunes dépendent de facteurs immunogénétiques et de facteurs d'environnement (Huck et *al*, 1996).

I.2. L'épidémiologie des maladies auto-immunes

L'épidémiologie des maladies auto-immunes reste difficile à déterminer avec précision, car il faut éviter les biais de sélections liés au regroupement des patients dans les grands centres hospitaliers. Par exemple, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Gougerot Sjögren et le diabète auto-immun (DID) sont des maladies auto-immunes fréquentes, leurs prévalences sont respectivement de 1000 à 4000 pour 100 000 habitants, 100 à 500 cas pour 100 000 habitants et 200 à 300 pour 100 000 habitants. Le lupus érythémateux systémique (LES) et la sclérodermie sont des maladies systémiques rares avec une prévalence respective de 15 à 50 pour 100 000 habitants, 20 pour 100 000 habitants (Cotten et *al*, 2013).

I.3. Les facteurs de risque

I.3.1. Sexe et l'âge

D'une façon générale, les maladies auto-immunes s'observent préférentiellement chez la femme (par exemple pour la sclérodermie, la prédominance féminine est de 3 à 6 femmes pour 1 homme) et à tout âge.

Chez la femme, ces maladies sont retrouvées en période d'activité ovarienne, avec un pic de fréquence entre 10 et 40 ans pour le lupus érythémateux systémique et entre 30 et 50ans pour la sclérodermie, alors que le syndrome de Gougerot Sjögren touche les femmes dans 90% des cas et s'observe surtout dans la période de la ménopause (âge moyen lors de l'apparition du premier symptôme est de 43 ans) (Armengol et *al*, 2014).

Plusieurs mécanismes pourraient rendre compte du rôle aggravant des estrogènes et de l'effet bénéfique des androgènes sur les MAI. Les estrogènes augmenteraient la sécrétion de la prolactine et celle des hormones de croissance, qui elles mêmes peuvent jouer un rôle dans la prolifération des lymphocytes T et B (Huck et *al*, 1996).

Les androgènes semblent exercer principalement des effets inhibiteurs sur la réponse immune en général et l'auto-immunité en particulier par des mécanismes agissant directement sur des cellules du système immunitaire ou sur certains organes cibles. Ces observations suggèrent qu'un déficit androgénique pourrait être associé à l'apparition de manifestations immunopathologiques (Edwards et *al*, 1989).

Les stéroïdes sexuels pourraient moduler la réponse immune car le thymus est une cible probable de ces hormones. De même, les androgènes semblent augmenter l'activité des lymphocytes T suppresseurs, peut-être par l'intermédiaire de l'IL-2 (Huck et *al*, 1996).

I.3.2. Facteurs génétiques

Les études génétiques réalisées dans les modèles animaux de MAI ont montré qu'il existait au moins 25 gènes qui peuvent contribuer à une susceptibilité particulière pour ces maladies. Ces gènes codent principalement pour les protéines du CMH de classe I et de classe II, les cytokines, les récepteurs des cytokines, les protéines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'apoptose. Chez l'homme, la présence de certains allèles du CMH est associée à une augmentation du risque de survenue de certaines pathologies auto-immunes (Bonnotte et *al*, 2004).

I.3.3. Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs externes favorisent le développement des maladies auto-immunes comme les rayons ultra-violet, les infections (Amoura et *al*, 2014), un mimétisme moléculaire entre les épitopes de certains agents infectieux (virus herpès, différents rétrovirus et le cytomégalovirus humain) (Subra et *al*, 2004).

I.3.4. Rôle des médicaments

Un certain nombre de médicaments et d'agents chimiques sont incriminés dans les maladies auto-immunes et en particulier dans le LES. Ce sont notamment, le procainamide (un anti-arythmique), l'hydralazine (un anti-hypertenseur) et le 5-azacytidine (Garaud et *al*, 2010). Le mécanisme d'action de ces drogues a été précisé puisqu'il fait intervenir une inhibition des ADN méthyltransférases (DNMTs) ou en amont une inhibition de la kinase Erk (Extracellular signal-regulated kinase) qui contrôle l'expression de DNMTs (Achour et *al*, 2014).

I.3.5. Le stress

Les conséquences biologiques du stress sont de mieux en mieux comprises. Au cours du stress, les glucocorticoïdes et les catécholamines libérées par l'axe hypothalamo-hypophysaire vont modifier l'équilibre des balances cytokiniques Th1/Th2 et Th17/Treg et être à l'origine

d'une inhibition de l'immunité cellulaire, d'une diminution de la tolérance immunitaire et d'une stimulation de l'immunité humorale. Ces modifications exposent les individus entre autre aux maladies auto-immunes. La prise en charge spécifique du stress devrait donc faire partie du traitement d'une maladie auto-immune.

Il active l'axe hypothalamo hypophyso surrénalien (HHS) et le système nerveux autonome à l'origine d'une sécrétion de glucocorticoïdes (GC) et de catécholamines dont le but est de rétablir l'équilibre qui préexistait à l'événement stressant. Cependant les effets au long cours du stress engendrent une diminution de l'immunité cellulaire et la stimulation de l'immunité humorale qui peuvent augmenter la susceptibilité aux maladies infectieuses, tumorales ou auto-immunes (Chamoux et *al*, 2013).

I.4. Mécanismes de défense

Le système immunitaire joue à la fois un rôle dans la destruction et dans la tolérance des cellules. Ainsi, notre système immunitaire tolère nos propres cellules. Pour qu'une MAI apparaisse, il faut aussi une rupture de tolérance immunitaire. Cette tolérance repose sur deux mécanismes de mécanisme de tolérance:

- Tolérance centrale (dans le thymus ou moelle osseuse).
- Tolérance périphérique (dans la circulation générale ou dans les organes lymphoïdes secondaires) (Bussone et *al*, 2009).

I.4.1. La tolérance centrale

Il s'agit de processus de tolérance centrale dont l'objet est de vérifier la capacité de reconnaissance et de réactivité des récepteurs à l'antigène nouvellement synthétisés vis-à-vis des antigènes du soi afin d'éviter l'émergence de cellules auto-réactives.

Au sein du thymus les récepteurs des LcT sont générés grâce à une recombinaison au hasard de segments géniques. Pour éviter la survenue de MAI, l'organisme doit éliminer les LcT fortement auto-réactifs. Au sein du thymus, tous les antigènes (Ag) de l'organisme sont présentés et tous les LcT qui reconnaissent fortement un auto-Ag meurent par apoptose. Cette sélection se résume par la phrase suivante: «l'organisme est tolérant à tout ce que le LcT voit dans le thymus». Le facteur de transcription (qui permet l'activation de gènes) auto-immune régulateur (AIRE) est impliqué dans l'expression de nombreux gènes codant pour de

nombreuses protéines. Aussi, une mutation de ce gène, qui induit une diminution de l'expression de plus d'une centaine de gènes au sein du thymus, est responsable de certaines maladies auto-immune systémique (comme: hépatite, anémie hémolytique, diabète type 1). Néanmoins, chez la grande majorité des patients atteints de MAI, aucune anomalie de l'expression de facteurs de transcription n'a été rapportée à ce jour (Bonnotte et *al*, 2004).

I.4.2. La tolérance périphérique

Il s'agit de la tolérance périphérique dont le but ultime est de moduler les réactions auto-immunes ainsi que de freiner les réponses immunitaires vis-à-vis d'exoantigènes afin d'éviter des réactions exacerbées dommageables pour l'organisme (Cotten et *al*, 2013).

Chez tous les individus il existe dans l'organisme des LcT reconnaissant avec une affinité faible des Ag du soi et qui sont exprimées par les cellules de l'organisme. Néanmoins dans la plupart des cas, les patients ne développent pas de MAI. Les deux principale raisons qui expliquent l'absence de ces maladies sont une présentation inefficace de l'auto-Ag par les cellules de l'organisme ne permettant pas l'activation des LcT auto-réactifs et une régulation efficace du système immunitaire (Bonnotte et *al*, 2004).

Différents mécanismes de défense permettent au système immunitaire de se protéger contre ces clones auto réactifs, pour les éliminer ou les inactiver (Figure 1) (Bussone et *al*, 2009).

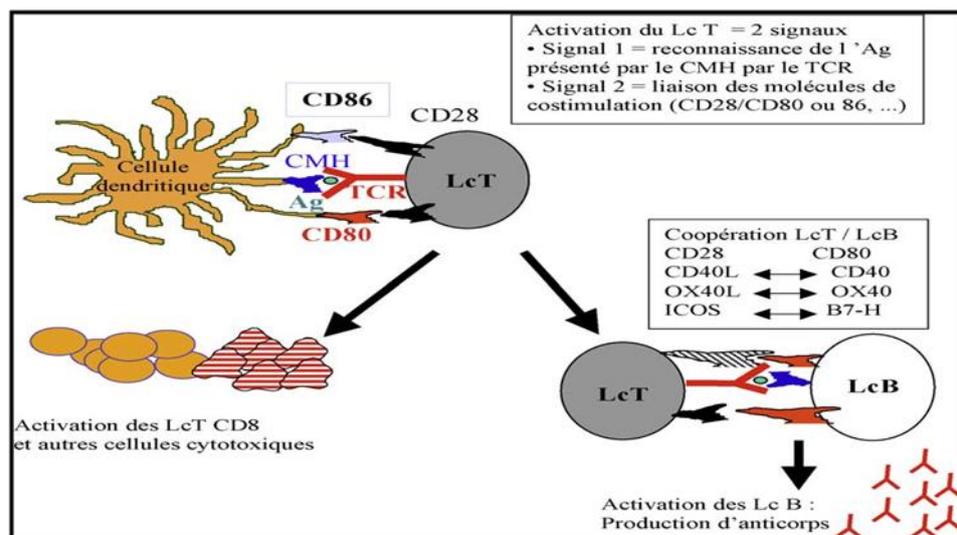


Figure 1: la réponse immunitaire (activation des LcT par les DC et coopération LcT et LcB) (Bonnotte et *al*, 2004).

I.5. Mécanisme de l'auto-immunité

Les mécanismes conduisant à une production des auto-anticorps (AAc) par une rupture durable de l'auto-tolérance sont mal connus. Les principaux mécanismes qui pourraient être impliqués sont les suivants:

- court-circuit des lymphocytes T auxiliaires tolérants: un antigène exogène peut présenter des similitudes de structures avec un antigène du soi de telle sorte que la même molécule portera des épitopes du non soi et un épitope du soi. Ainsi, des lymphocytes T reconnaissant un épitope étranger, non toléré, pourront coopérer avec des lymphocytes B dirigés contre l'épitope commun au soi et à l'antigène exogène, permettant ainsi aux lymphocytes B de produire de grandes quantités d'AAc. Ce mimétisme moléculaire pourrait rendre compte du rôle des infections dans l'auto-immunité. De façon analogue, la modification physique (UV, chaleur) ou chimique (médicaments hapténiques) d'un auto-antigène peut déclencher une auto-immunisation.
- L'expression anormale des molécules HLA de classe II à la surface de cellules, qui, naturellement, n'en expriment pas, peut permettre à des lymphocytes T ayant échappé à la délétion et à l'anergie de reconnaître un auto-antigène. Des infections, en particulier virales, peuvent induire une telle expression. Cela n'est pas suffisant expérimentalement pour induire une maladie auto-immune, mais dans la mesure où l'auto-immunisation est multifactorielle, ce mécanisme peut être un des éléments impliqués. Un défaut de contrôle par des cellules T suppressives peut aussi contribuer à l'auto-immunisation, comme le montrent certains modèles animaux et comme le suggèrent les déficits en fonctions T-suppressives constatés dans nombre de maladies auto-immunes (Dighiero et al, 2003).

I.6. Mécanismes lésionnels des maladies auto-immunes

L'intensité de l'activation des lymphocytes B auto-réactifs se traduit par la production d'une quantité importante d'auto anticorps correspondants. Cette intensité peut être corrélée à l'importance du processus physiopathologique et donc à la sévérité de la MAI. Lorsque les auto-Ac produits sont directement responsables des lésions tissulaires ou cellulaires. On conçoit que la mesure des taux des anticorps pathogènes soit un indicateur fidèle et direct du

processus lésionnel. Au cours des MAI non spécifiques d'organe, la présence et le taux de certaines auto-Ac ont une valeur pronostique (Achour et *al*, 2014).

I.7. Classification des maladies auto-immunes

La classification de certaines pathologies auto-immunes est basée sur la physiopathologie et le type d'auto-anticorps correspondants (Tableau 1) (Subra et *al*, 2004). Ces maladies sont divisées en deux grands groupes:

- MAI spécifiques d'organes (anticorps anti tissus ou anti cellules),
- MAI non spécifiques d'organe (anticorps antinucléaires (ANA)).

I.7.1. Les maladies auto-immunes spécifiques d'organes

I.7.1.1. Diabète de type 1

Le DID est une maladie auto-immune spécifique d'organe. C'est la conséquence d'une carence d'insulino-sécrétion due à la destruction spécifique des cellules β des îlots de Langerhans par un processus auto-immune [(Wémeau et *al*, 2014), (Laforgue et *al*, 2000)].

I.7.1.2. Thyroïdites auto-immunes

Les maladies thyroïdiennes (hypothyroïdie, hyperthyroïdie, nodules thyroïdiens) sont les pathologies endocriniennes les plus fréquentes chez les femmes en âge de procréer. La thyroïde peut être le siège de maladies auto-immunes, par l'action des auto-anticorps dirigés contre les cellules thyroïdiennes. Il existe de plus des augmentations des besoins métaboliques et des modifications du système immunitaire pouvant être un facteur de dérégulation ou de révélation de ces maladies thyroïdiennes (Bricaire et *al*, 2015).

I.7.1.3. Hépatite auto-immune

L'hépatite auto-immune (HAI) est une pathologie inflammatoire chronique du foie, de cause inconnue, qui affecte les enfants et les adultes des deux sexes, avec une prédilection pour les femmes (75 %) (Cacoub et *al*, 2014).

I.7.1.4. La myasthénie

La myasthénie se caractérise par une faiblesse musculaire et une fatigabilité anormale à l'effort. C'est une maladie auto-immune due à la présence d'anticorps dirigés contre des composants de la membrane musculaire localisés au niveau de la jonction neuromusculaire. Dans la majorité des cas, il s'agit d'auto-anticorps dirigés contre le récepteur de l'acétylcholine (RACH) (Eymard *et al*, 2014).

I.7.2. Les maladies auto-immunes non spécifiques d'organes

I.7.2.1. Lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune non spécifique d'organe, affecte préférentiellement les femmes jeunes, mais elle peut toucher aussi les enfants et les personnes âgées (Amoura *et al*, 2014).

C'est une pathologie inflammatoire chronique rare, caractérisée par la production excessive de divers anticorps dont les plus spécifiques sont dirigés contre certains composants du noyau tels que l'ADN natif et les nucléosomes (Eriksson *et al*, 2011). Sur le plan clinique; elle peut être responsable d'une atteinte cutanée, articulaire, rénale, hématologique, cardiaque ou neurologique, les séreuses et/ou d'autres organes. Cette affection conduit à des expressions cliniques différentes d'un sujet à l'autre avec comme point commun des poussées entrecoupées par des périodes de rémission (Meyer *et al*, 2010).

I.7.2.2. Le syndrome de Gougerot-Sjögren

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune inflammatoire chronique de cause inconnue. Elle est souvent caractérisée par une diminution de la sécrétion des glandes lacrymales, déterminant une xérophtalmie, et par une réduction de la sécrétion des glandes salivaires, responsable d'une xérostomie, d'où la dénomination de "syndrome sec" (Attia *et al*, 2010).

L'infiltration lymphocytaire des glandes salivaires qui caractérise ce syndrome présente une bonne accessibilité facilitant le diagnostic et la recherche clinique (Fauchais *et al*, 2014).

Le syndrome de Gougerot-Sjögren est divisé en primaire ou secondaire. Ce dernier est associé aux collagénoses, telle qu'une polyarthrite rhumatoïde, un LES, un connectivite

mixte, une sclérodermie, une polymyosite-dermatomyosite ou une polychondrite récidivante (Carvajal. et *al*, 2015).

I.7.2.3. Sclérodermie

La Sclérodermie systémique est une pathologie touchant le tissu conjonctif, les artérioles et les microvaisseaux, caractérisée par la survenue d'une fibrose cutanée et viscérale ainsi que des phénomènes ischémiques. À ce jour, les thérapies proposées sont limitées et aucun traitement anti fibroses n'a fait preuve d'efficacité (Daumas et *al*, 2013).

I.7.2.4. La connectivite mixte

La connectivite mixte est une maladie inflammatoire chronique qui se manifeste par des symptômes très variables d'une personne à l'autre et qui peut toucher tous les organes. Les principales manifestations sont des douleurs articulaires et musculaires, un gonflement des mains et des doigts et une grande fatigue. Dans certains cas, les poumons, le cœur, les reins et/ou la peau peuvent aussi être touchés (Harb et *al*, 2004).

Les connectivites (Connective Tissue Diseases, CTD) rassemblent un certain nombre de syndromes dont l'étiopathogénie n'est que partiellement comprise, mais dont le point commun réside en une atteinte inflammatoire auto-immune d'un ou de plusieurs organes. La validation de critères de diagnostics a permis aux cliniciens de les individualiser avec plus de sécurité, en fonction de caractéristiques clinico-biologiques propres à chacune d'entre elles (Lerner et *al*, 2007). Elle est caractérisée par une réponse immune dirigée contre des constituants du noyau cellulaire qui sont les ribonucléoprotéines (RNP) (Coughlin et *al*, 2013).

Tableau 1: Comparaison des maladies auto-immunes spécifiques d'organes et non spécifiques d'organe [(Ernerudh. J, et al, 2006) ET (Atouf. O, et al, 2012)].

	MAI spécifiques d'organes	MAI non spécifiques d'organes
Antigène	Essentiellement localisé dans un organe donné.	Répandu dans l'organisme entier.
Lésions	L'antigène tissulaire est la cible de l'attaque immunologique.	Dépôts de complexes immuns circulants, en particulier dans les reins et les articulations.
Associations	Avec d'autres anticorps ou des maladies spécifiques d'organes.	Avec d'autres anticorps ou des maladies non spécifiques d'organes.

II. Les marqueurs des maladies auto-immunes

Les anticorps (Ac) sont des caractéristiques biologiques mesurées et évaluée comme un indicateur soit d'un processus biologique normal ou pathologique (Tron et al, 2014).

Si ces marqueurs dit les auto-anticorps dans le cas des maladies auto-immunes sont toujours dirigés contre des composants du soi, ils ne sont toutefois pas spécifiques de l'individu, puisqu'ils reconnaissent des déterminants publics, présents chez tous les individus d'une même espèce, et parfois comme c'est le cas des auto-anticorps anti-ADN (Dighiero et al, 2003).

II.1. Le rapport entre les auto-anticorps naturels et pathologiques

Le rapport entre auto-anticorps naturels et pathogènes reste à définir. La première hypothèse propose que les auto-anticorps pathologiques sont la conséquence d'une stimulation polyclonale incontrôlée des cellules auto-réactives normales, ce qui entraîne une augmentation au delà d'un seuil tolérable des auto-anticorps.

La deuxième hypothèse assume que les auto-anticorps pathologiques sont la conséquence d'un processus de sélection induit par l'auto-antigène, qui induit des mutations somatiques résultant de la production d'un auto-anticorps pathologique de forte affinité.

Ceci pourrait être en faveur d'un processus de sélection dirigé par l'antigène dans le cas des auto-anticorps pathogènes, ou alternativement, que les auto-anticorps naturels et pathogènes sont produits par des clones B différents (Dighiero et *al*, 2003).

II.2. Les auto-anticorps antinucléaires (ANA)

Les auto-anticorps anti-nucléaires sont utilisés pour diagnostiquer une MAI, systémique. Elles sont donc des biomarqueurs pouvant être utilisés avec des objectifs divers au cours des MAI non spécifiques d'organe. La valeur d'un biomarqueur et du test qui le mesure doit être cependant évaluée sur des critères rigoureux, de même que le niveau de preuve d'utilité clinique. Ils sont le produit de clones lymphocytaires B auto-réactifs dont l'activation et la différenciation sont la conséquence du processus auto-immun [(Tron et *al*, 2014) et (Beauvillain et *al*, 2006)].

Les ANA sont des isotypes IgG, qui regroupent de nombreux auto-anticorps dirigés contre des protéines participant à la structure et aux fonctions du noyau cellulaire (ADN, histones, centromères, antigènes nucléaires solubles...) (Dubucquoi et *al*, 2004). Ils sont principalement recherchés au cours des connectivites, incluant le LES, la sclérodémie systémique, le syndrome de Gougerot-Sjogren et la connectivite mixte (Degenne et *al*, 2006).

Les anticorps antinucléaires (ANA) sont les marqueurs sériques les plus caractéristiques. Leur cible antigénique est généralement localisée dans des complexes supramoléculaires comme le nucléosome, le splicéosome, la particule ribonucléoprotéique Ro et le ribosome (Degenne et *al*, 2006).

Les Auto-anticorps anti-antigènes nucléaires sont divisés en deux groupes (Figure 2):

- Non soluble la chromatine et ses constituants: Ac anti-ADN natif (ADNn) et anti-ADN simple brin (ADNsb), Ac anti-ARN, anti-histone.
- Antinucléosome solubles: Ac anti-Sm, anti-U1-RNP, anti-SSA et anti-SSB Soluble: SSA, SSB, ACA, RNP (Meroni et *al*, 2010).

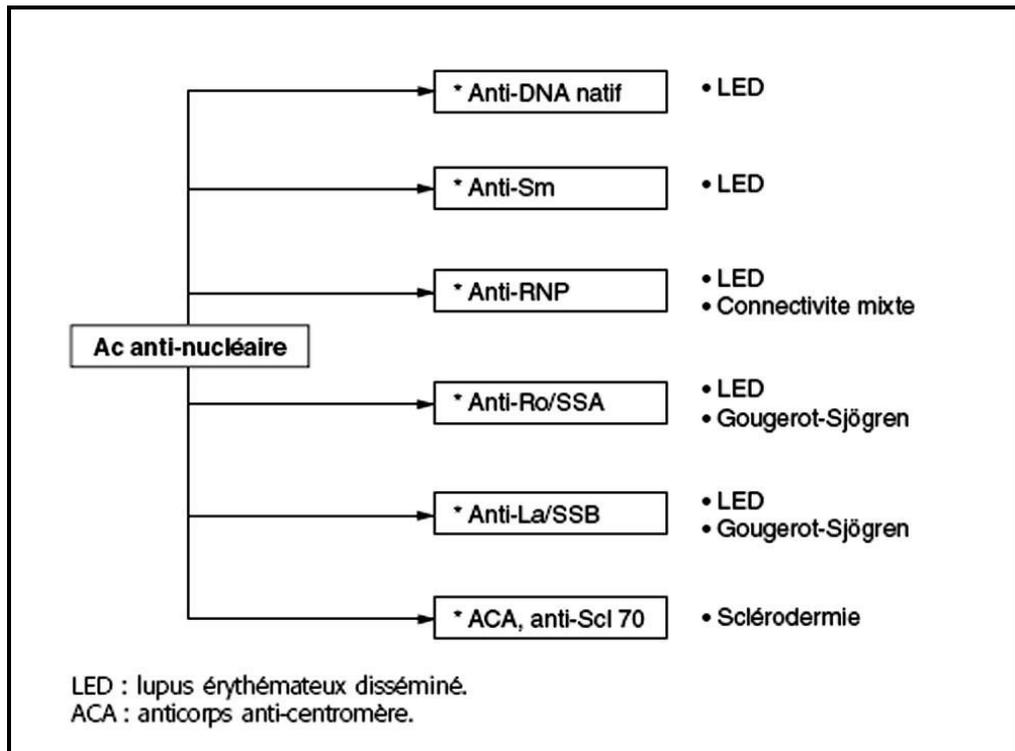


Figure 2: les auto-anticorps antinucléaires dans les principales maladies auto-immunes systémiques (Emile et *al*, 2010).

II.2.1. Anti-DNA natif

Les anticorps anti-ssDNA dirigés contre l'ADN simple brin, dénaturé, dont la cible est fréquemment représentée par les bases puriques ou pyrimidiques cachées dans la double hélice d'ADN et les anticorps anti-dsDNA dirigés contre l'ADN double brin natif (Hamann et *al*, 2014).

Les anticorps anti-dsDNA par contre sont très spécifiques du LES. Il faut donc spécifiquement les rechercher lorsque l'IFI révèle une fluorescence homogène (Dueymes et *al*, 2007).

II.2.2. Antihistones

Les histones sont des protéines basiques, riches en arginine et en lysine qui, avec la double hélice d'ADN, constituent la majeure partie de la chromatine. Il existe 5 différentes classes d'histones (H1, H2B, H2A, H3 et H4). Des anticorps contre les différentes classes d'histones ont été décrits dans le lupus, mais ne sont pas limités à cette maladie (Dueymes et *al*, 2007).

II.2.3. Anti-nucléosome

Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, est composé d'ADN en double hélice et d'histones. Les anticorps anti-nucléosome (ou anti-chromatine) se lient aux complexes d'ADN et d'histones mais pas à leurs composants individuels. Au même titre que les anticorps anti dsDNA, ils sont très spécifiques du LES (Dueymes et *al*, 2007).

II.2.4. Anti-Smith (anti-Sm)

Les anticorps anti-Sm ont pour cible des protéines faisant partie d'un sous-groupe de ribonucléoprotéines, les small nuclear ribonuclear protein (sRNP). Les anticorps anti Sm sont détectés chez 5 à 30% des patients avec un LES, donc ils sont très spécifiques de ce type des MAI (Caquet et *al*, 2008).

II.2.5. Anti-Ro/SSA et anti-La/SSB

Les anticorps anti-Ro/SSA et anti-La/SSB sont dirigés contre des protéines faisant partie d'un complexe antigénique hétérogène. Le complexe Ro/La, constitué de trois protéines différentes (52 kD Ro, 60 kD Ro et 48 kD La) et de petits ARN (Y1, Y2, Y3, Y4 et Y5) synthétisés dans le noyau sous le contrôle d'une ARN polymérase III, dont le rôle est peu clair. Les anticorps anti-Ro/SSA et les anticorps anti-SS-A sont retrouvés dans le syndrome de Gougerot Sjogren primitif avec la plus grande fréquence: 60 à 95 %, avec un poids moléculaire de 60 kD SA-60 et SSA-52 est appendu à l'extrémité 5' et anti-La/SSB à SSB-48 appendu à l'extrémité 3', sont principalement associés à deux connectivites : le syndrome de Sjogren et le LES (Dueymes et *al*, 2007).

Les anticorps anti-Ro/SSA sont retrouvés chez 10 à 60% des patients avec un LES. De plus, environ 50% des patients présentant un LES avec anticorps anti-Ro/SSA ont également des anticorps anti-La/SSB. Fait important à retenir, les grossesses des patientes présentant des anticorps anti-Ro/SSA ou anti-La/SSB peuvent se compliquer d'un lupus néonatal (Amoura et *al*, 2004).

II.2.6. Anti-RNP

Comme les anticorps anti-Sm, les anticorps anti-nucléo protéine (anti-RNP) sont dirigés contre des protéines faisant partie des snRNP, et plus précisément contre des protéines

associées à l'ARN. Ce sont donc des anticorps anti-U1RNP (Lerner et *al*, 2007). Ces anticorps sont souvent détectés chez les patients avec un LES, alors que des titres élevés de ces Ac sont nécessaires au diagnostic de la connectivite mixte (Dueymes et *al*, 2007).

II.2.7. Anti-Scl-70

Les anticorps anti-Scl-70 ou antitopoisomérase I sont très spécifiques de la sclérodermie systémique. Ils sont très rarement retrouvés chez des patients avec une autre connectivite ou chez des sujets sains sont associés à la forme cutanée limitée de la sclérodermie systémique (Renaudineau et *al*, 2006).

II.2.8. Anti-centromère (ACA)

Le centromère est la zone du chromosome au niveau de laquelle, pendant la mitose, les deux chromosomes frères restent attachés avant de se séparer. Il existe à ce niveau une structure appelée kinétochore qui permet l'arrimage des chromosomes sur les fibres du fuseau mitotique pour permettre leur migration vers les deux pôles de la cellule. Les anticorps anti-centromères, qui devraient plutôt être appelés anti-kinétochore, reconnaissent différentes protéines de cette structure. Anticorps anti-centromère sont très spécifiques de la sclérodermie systémique cutanée limitée (Dueymes et *al*, 2007).

II.3. Le rôle des auto-anticorps

- **Le rôle physiologique des auto-anticorps naturels :** le rôle physiologique des ANA reste à définir. Il est très probable que ces ANA constituent une composante essentielle de l'immunité naturelle et qu'ils jouent un rôle majeur comme première barrière de défense. Ce système, très bien conservé pendant l'évolution, aurait pour rôle d'établir une première barrière de défense, en attendant que le système immunitaire produise des anticorps spécifiques (Dighiero et *al*, 2003).
- **Les auto-anticorps font partie des critères de diagnostic :** ils ont pris place parmi les critères de diagnostic d'un certain nombre de maladies auto-immunes du fait d'une meilleure compréhension des pathologies impliquant le système immunitaire et de la mise au point de techniques de dépistage, d'identification et de quantification plus performantes (Atouf et *al*, 2012).
- **Les auto-anticorps donnent une orientation sur le diagnostic:** l'exemple type de l'orientation du diagnostic par les AC est la recherche des ANA par

immunofluorescence indirect (IFI) sur cellule Hep2. Selon l'aspect de la fluorescence, le biologiste oriente sa recherche vers un certain nombre d'AC et choisit le test à réaliser en seconde intention pour identifier les cibles antigéniques et pose le diagnostic. Ainsi, un aspect homogène fait rechercher des AC dirigés contre les dsDNA et les histones qui sont associés au lupus. Un aspect moucheté grossier est en faveur d'un anti-ribonucléoprotéine (RNP), ou d'un anti-Smith (anti-Sm) qui sont associés aux connectivites mixtes ou au lupus. Un aspect moucheté moyen correspond à un anti-SSA, ou SSB ce qui est en faveur d'un syndrome de Gougerot- Sjögren ou d'un lupus. Un aspect moucheté fin évoque un anti-Scl 70 spécifique de la sclérodermie. Un marquage moucheté des noyaux comportant 46 grains réguliers fluorescents est en faveur d'un anti-centromère qui est associé au CREST syndrome (calcinose, phénomène de Raynaud, dysmotilité œsophagienne, sclérodactylie, télangiectasies) (Atouf et *al*, 2012).

- **Les auto-anticorps sont à la base de la classification des maladies auto-immunes :** l'importance de la place des Ac est aussi démontrée par le fait qu'ils font partie des critères biologiques de classification de certaines pathologies auto-immunes (Atouf et *al*, 2012).
- **Les auto-anticorps peuvent aider au diagnostic différentiel :** dans un certain nombre de situations pathologiques où plusieurs diagnostics sont évoqués, les AC peuvent apporter un élément en faveur de l'un ou de l'autre diagnostic (Atouf et *al*, 2012).
- **Les auto-anticorps peuvent constituer un élément du suivi thérapeutique :** le dernier rôle et pas des moindres que l'on peut attribuer aux AC est le fait qu'ils soient dans certaines pathologies de bons indicateurs de l'évolution sous traitement (Atouf et *al*, 2012).

III. La recherche des auto-anticorps

La recherche des auto-anticorps est un examen très régulièrement utilisé dans les situations cliniques peu claires. Leur détection repose sur une démarche en cascade avec deux méthodes qui sont habituellement utilisées pour rechercher les ANA (Figure 3). Il faut commencer par un dépistage à l'aide d'une immunofluorescence indirecte, puis si le dépistage est positif, il se poursuit par une étape d'identification grâce à la méthode immuno-dot, dont l'objectif est la caractérisation du ou des antigènes cibles reconnus par l'ANA dépisté (Sibilia et *al*, 2002).

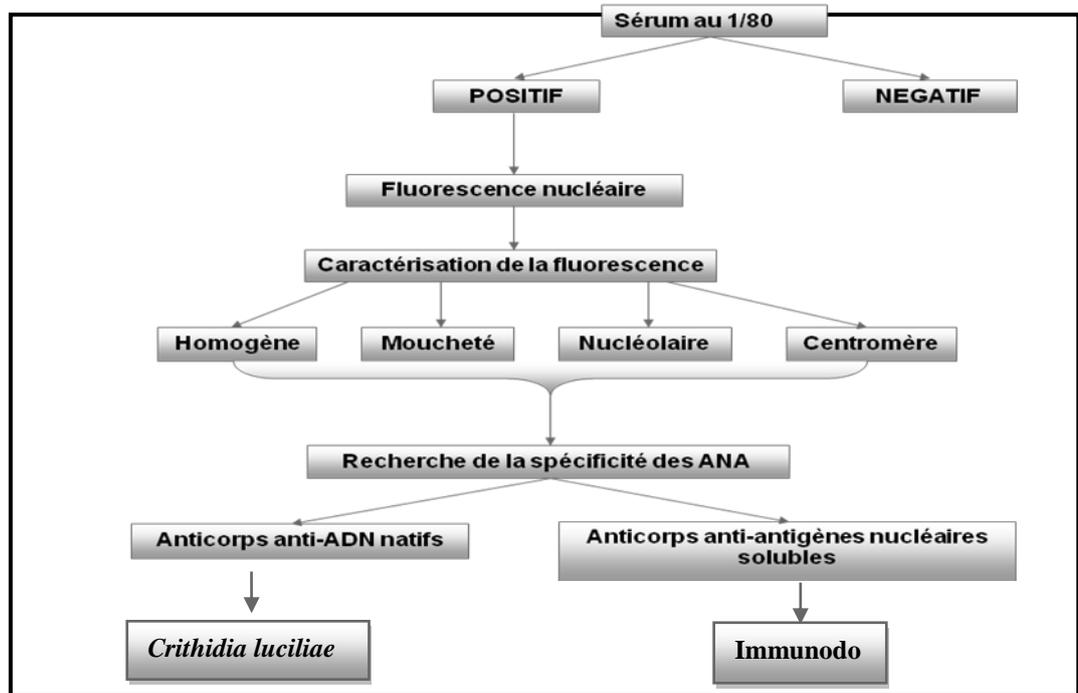


Figure 3: la recherche d'ANA [(Foggia. P, et al, 2013), (Castro. C, et al, 2010)].

III.1. Principe de l'immunofluorescence indirecte

L'IFI utilise les propriétés de la réaction antigène/anticorps. Cette technique permet de détecter les sérums contenant des auto-anticorps reconnaissant différents antigènes antinucléaire (Figure 4). Elle est effectuée sur des frottis de cellules Hep-2 au Hep 2000 qui sont des cellules de carcinome laryngé humain utilisées dans la plupart des kits commerciaux [(Madsen et al, 2010), (Bonaguri et al, 2012)].

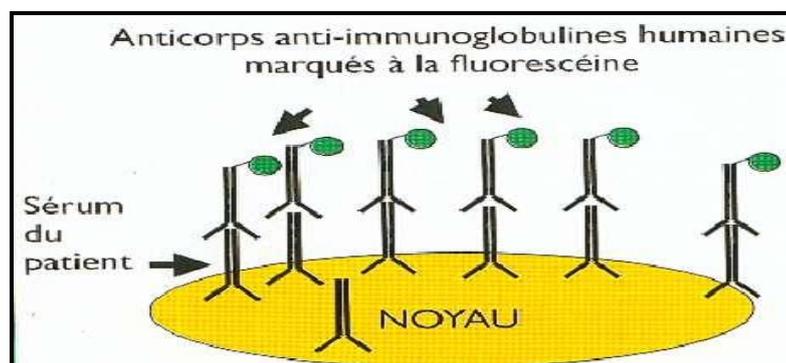


Figure 4: anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués à la fluorescéine (Liu et al 2014)

L'aspect de la fluorescence obtenu peut orienter vers une spécificité particulière mais il faut la confirmer par des techniques spécifiques (Immunodot et *Crithidia luciliae*) (Bradwell et al, 2006).

L'immunofluorescence indirecte reste à l'heure actuelle la technique de dépistage pour la plupart des auto-anticorps. Les images de fluorescence observées (Figure 5) donnent une première information sur l'identité de la cible (Tableau 2) [(Bradwell et al, 2006), (Goulvestr et al, 2006)]. D'autres méthodes vont permettre l'identification précise de la nature moléculaire de l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps détecté (Büttner et al, 2009).

Tableau 2: Principaux anticorps évoqués en fonction de l'aspect sur cellules Hep2000 (Goetz et al, 2012).

Aspect de fluorescence	Spécificité évoquée
Homogène	Anti-ADN natif, anti-histone, anti-nucléosome
Moucheté	RNP, Sm, SSA, SSB, Scl70
Nucléolaire	Anti-/Scl,
centromérique	Centromère

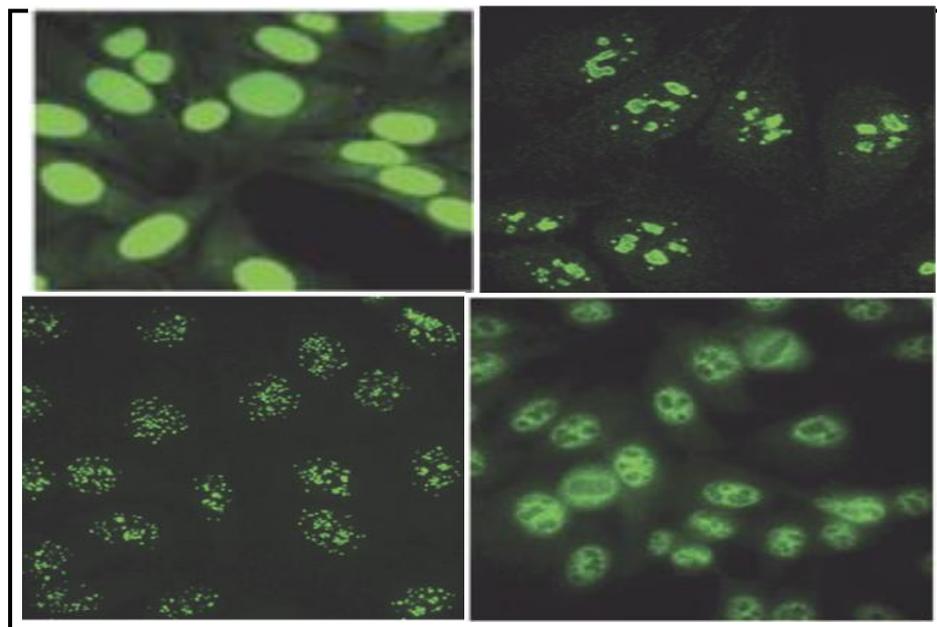


Figure 5: Les principaux aspects de fluorescence [(Bottino et al, 2015), (Foggia et al, 2013)].

III.2. Le tests Immunodot

C'est une méthodologie utilisée pour la détermination des auto-anticorps antinucléaires solubles, déposés sous forme de gouttes et fixés sur des bandelettes de nitrocellulose. Les bandelettes ainsi parées sont incubées avec le sérum du patient étudié (Figure 6) (Beauvillain et al, 2006).

La technologie Immunodot est la seconde étape est la confirmation de la spécificité antigénique (Bahon Riedinge et al, 2004).

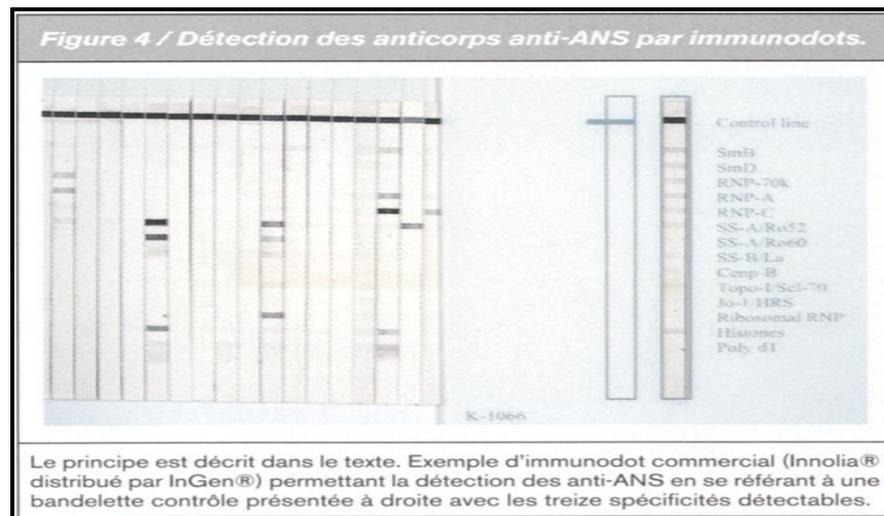


Figure 6: Détection des anticorps anti-ANS par immunodot (Beauvillain et al, 2006).

III.3. DNA *Crithidia luciliae*

Les anti-ADN natifs déterminés par immunofluorescence indirecte sur *Crithidia lucialiae* (El Hajj et al, 2009). C'est un test de détection indirecte des anticorps immunofluorescents qui utilise comme substrat les *Crithidia luciliae*, hémoflagellées. Cet organisme à cellule unique possède une mitochondrie géante qui contient une masse fortement condensée d'ADN double brin (Duhamel et al, 2010).

Les auto-anticorps anti-ADN double brin sont présents de façon quasi exclusive chez les patients atteints du lupus et sont donc considérés comme des anticorps marqueurs. Il semble que cette masse d'ADN double brin, connue sous le nom de kinétoplaste, sert de substrat sensible et spécifique pour la détection d'auto-anticorps anti-ADN double brin (Percannella et al, 2011).

Alors que le test utilisé habituellement pour la détection des ANA est un test sensible pour la détection du lupus et d'autres maladies des tissus conjonctifs, il est loin d'être

spécifique au lupus (Hachulla et *al*, 2007). Pour cette raison, tous les échantillons ANA positifs devraient être testés pour la détection spécifique d'anticorps anti-ADN double brin (Goetz et *al*, 2005). La présence de ces anticorps (Figure 7) indique fortement une présence de lupus; toute fois, leur absence n'exclut pas le SLE dans tous les cas (Iannello et *al*, 2011).

Diverses méthodes ont été utilisées au fil des ans pour la détection des anticorps anti-ADN double brin. L'avantage principal d'un tel test est basé sur les *C. luciliae* est sa spécificité, en raison de la nature de la masse circulaire fortement spiralée d'ADN double brin dans le kinétoplaste. Cette caractéristique est extrêmement importante pour un test de détection des anticorps marqueurs (Chimica et *al*, 2010).



Figure 7: Aspect homogène de DNAn (Foggia et *al*, 2013).

IV. L'intérêt pratique des anticorps antinucléaires

La plupart des maladies auto-immunes systémiques sont caractérisées par des auto-anticorps dont la valeur du diagnostic (spécificité et sensibilité) est variable (Bahon-Riedinge et *al*, 2002). Ces principaux anticorps antinucléaires, sont résumés dans le (Tableau 3).

Tous les anticorps antinucléaires n'ont pas une spécificité de diagnostic absolue, mais certains d'entre eux, comme les anti-Sm, les anti-SSA et anti-SSB, sont exclusivement observés au cours des maladies auto-immunes (Büttner et *al*, 2009). Certains d'entre eux peuvent avoir une valeur pronostique, comme par exemple les anti-ADN natifs et les anti-nucléosomes associés à des formes sévères de lupus avec atteinte rénale, les anti-Scl 70 associés à des sclérodermies systémiques compliquées de fibroses pulmonaires (Castro et *al*, 2010).

Tableau 3: Association clinique des principaux ANA (Sibilia et al, 2002)

Auto-anticorps	Maladie associée (sensibilité %)
Anti-ADN natif	Lupus Erythémateux Disséminé= LED 50-70%
Anti-RNP	Connectivite mixte (95%) LED 10-15%
Anti-Sm	LED (15-25%)
Anti-SSA	Syndrome de Gougerot Sjogren (60-80%), LED 20-40%)
Anti-SSB	Syndrome de Gougerot Sjogren (50-70%), LED (10-20%)
Anti-Scl70	Sclérodermie 30%
Anti-centromère	Syndrome CREST (85%)

Matériel et méthode

I. Matériels et méthode

Cette étude descriptive et analytique s'est déroulée au sein du laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire Constantine (HMRUC) entre 20 Avril et 20 Mai 2015, portant sur 40 patients chez qui nous avons recherché des maladies auto-immunes systémiques.

A l'aide d'un questionnaire nous avons pu extraire les critères suivant :

- les données relatives au patient.
- signes cliniques.
- les données biologique et radiologique.

En plus, une recherche d'anticorps antinucléaires (ANA) a été réalisée chez 50 patients, parmi lesquels 40 patients sont ANA positives (85% sont des femmes).

I.1. Prélèvement sanguin

Nous avons effectué le prélèvement sanguin en suivant une méthodologie adoptée dans ce travail, consiste d'abord à l'enregistrement de la demande d'examens. Pour chaque malade les tubes de prélèvement doivent être étiquetés avec des codes-barres contenant les renseignements des patients. Ces données doivent être aussi inscrites sur des fiches avec la date et le lieu de prélèvement.

Le sang de patient est recueilli sur tube suc et centrifugés à 3000 rpm pendant 5 min et acheminé au laboratoire dans un réfrigérateur pour y être conservé à une température de 4C⁰.

Chaque patient a bénéficié d'un bilan biologique incluant le dosage des anticorps antinucléaire (ANA) [ou des facteurs antinucléaires (FAN): auto-anticorps non spécifique d'organe].

I.2. Le dosage

La détection des ANA repose sur une démarche en cascade, car toute recherche commence par un dépistage grâce à une immunofluorescence indirecte (IFI), puis, si le dépistage est positif, il sera suivi d'une étape d'identification par la technique de l'immunodot (ANA prophile 3) pour l'identification des auto-anticorps soluble et le test de Crithidia luciliae pour l'identification des DNAn.

I.2.1. Dépistage des auto-anticorps par la méthode d'IFI

I.2.1.1. Principe

La technique d'immunofluorescence est une technique sérologique basée sur la réaction antigène/anticorps (Figure 8).

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 auto-anticorps, est mis au contact d'un substrat (tissus ou cellules déposés dans les puits d'une lame de microscope).

Après lavage, pour éliminer les protéines fixées faiblement de manière non spécifique, une deuxième incubation est réalisée avec un anti-sérum spécifique des immunoglobulines humaines marqué par des fluorochromes (Figure 8). Ce 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'ultra-violet. 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 épilumination.

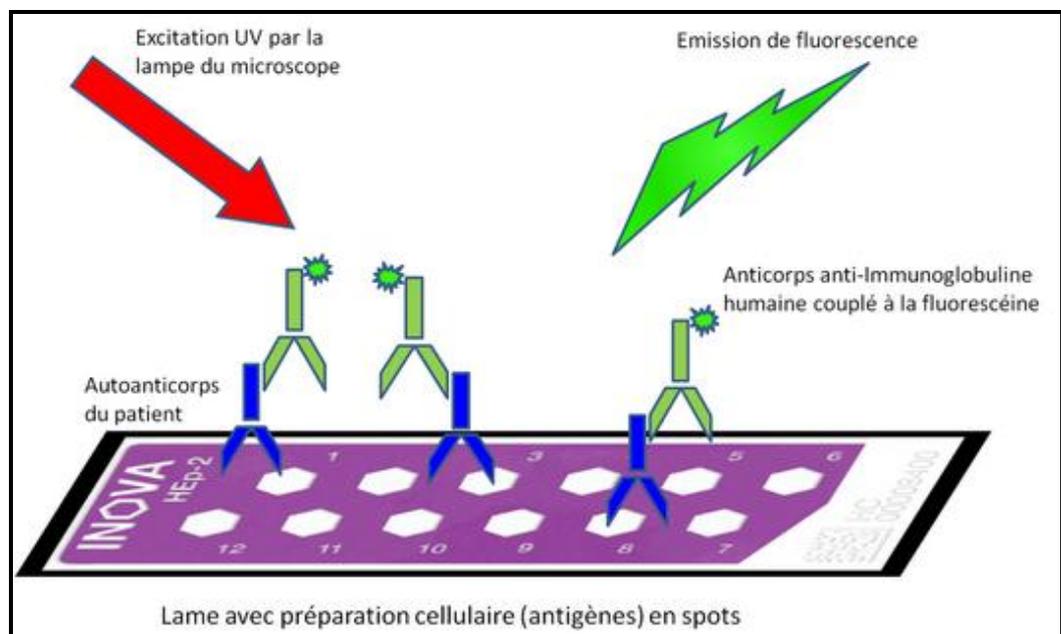


Figure 8: les étapes de l'immunofluorescence indirecte (IFI).

I.2.1.2. Le mode opératoire

1^{ère} étape : dilution

Dilution du sérum à tester en 1 /80 dans le par le PBS.

10 µl du sérum+790 µl du PBS

2^{ème} étape : incubation des échantillons

1. Choisir les lames et les contrôleurs spécifiques pour chaque lame (selon le type de l'Ac recherché).
2. Mettre le contrôle positif et négatif dans les deux premiers puits des lames.
3. Pipeter 25 µL de chaque échantillon dilué dans les puits respectifs de la microplaque (Figure 9).

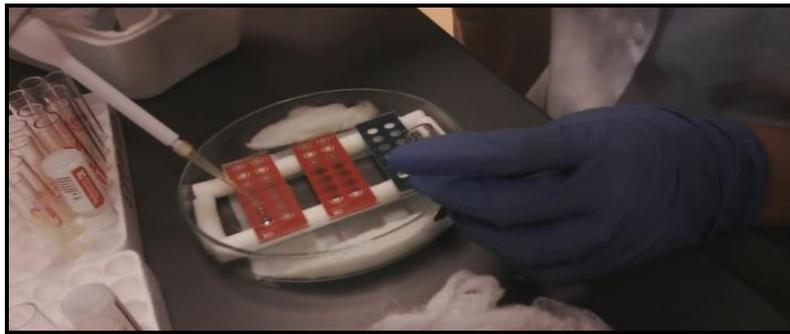


Figure 9: les échantillons dans les microplaques

4. Incuber pendant 30 min à une température ambiante (18-25°C) dans une chambre humide (Figure 10).

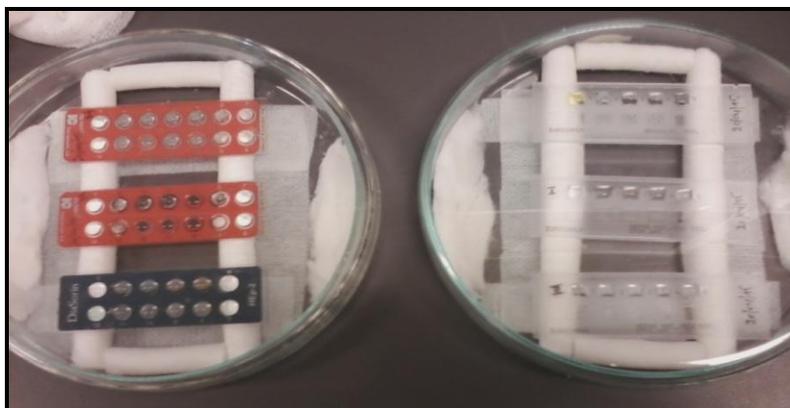


Figure 10: incubation des échantillons.

3^{ème} étape : lavage

Laver les plaques 2 fois avec le tampon de lavage dilué PBS Pour éliminé l'excès de solution (Figure 11), en frappant la plaque retournée sur du papier absorbant.



Figure 11: premier lavage de la microplaque après incubation.

4^{ème} étape : addition du conjugué

1. Pipeter 20 μ L de conjugué enzymatique (anticorps de chèvre anti-Ig humaines marqué) dans chaque puits (Figure 12).

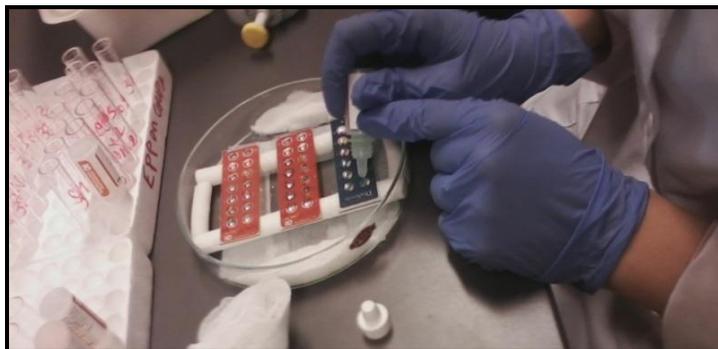


Figure 12: le conjugué enzymatique sur microplaque.

2. Incuber 30 min à température ambiante (18-25°C) à l'abri de la lumière directe dans une chambre noire (Figure 13).

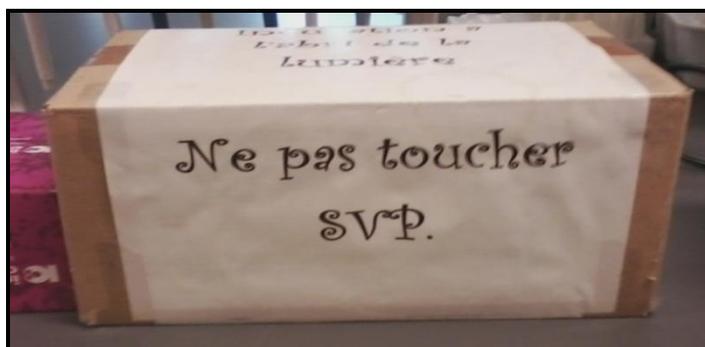


Figure 13: incubation des échantillons.

5^{ème} étape : 2^{ème} lavage

- Laver les plaques 2 fois par PBS et le bleu de Vence (10 gouttes dans un PBS) pendant 5 min dans la première fois (Figure 14).

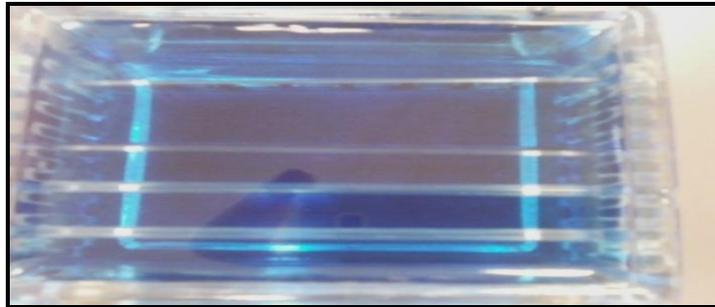


Figure 14: lavage de microplaque avec le bleu de Vence.

- Et dans le tampon de lavage PBS pendant 5 min dans la 2^{ème} fois (Figure 15).



Figure 15: lavage de microplaque par PBS.

6^{ème} étape : séchage

1. Séchage des lames par le papier absorbant (Figure 16).

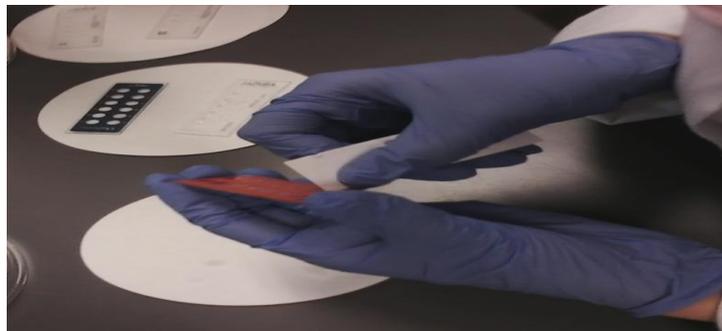


Figure 16: séchage des microplaques.

2. Mettre 10 μL de l'huile à immersion (milieu de montage), et elle devra être adaptée au type et à la marque de microscope utilisé (Figure 17).



Figure 37: mettre l'huile de montage.

3. Mette lamelle sur lame.

7^{ème} étape : lecture

C'est l'étape d'évaluation à l'aide d'une analyse visuelle des lames par microscope (Figure 18) et interprétation des résultats. Le résultat obtenu est sous forme des aspects de la fluorescence (Figure 19).



Figure 48: analyse des lames par microscope à fluorescence.

La détection des auto-anticorps effectuée sur les cellules obtenues dans les lames génère des aspects de fluorescence spécifiques. Les quatre aspects principaux décrits pour la fluorescence du noyau sont les suivants (Figure 19).

- **Homogène:** Ac anti ADN, anti histones ou anti nucléosome.

- **Mouchetée:** Ac anti antigènes nucléaires solubles (ENA).

-**Nucléolaire :** Ac anti antigènes.

- **Centromérique:** Ac anti antigènes.

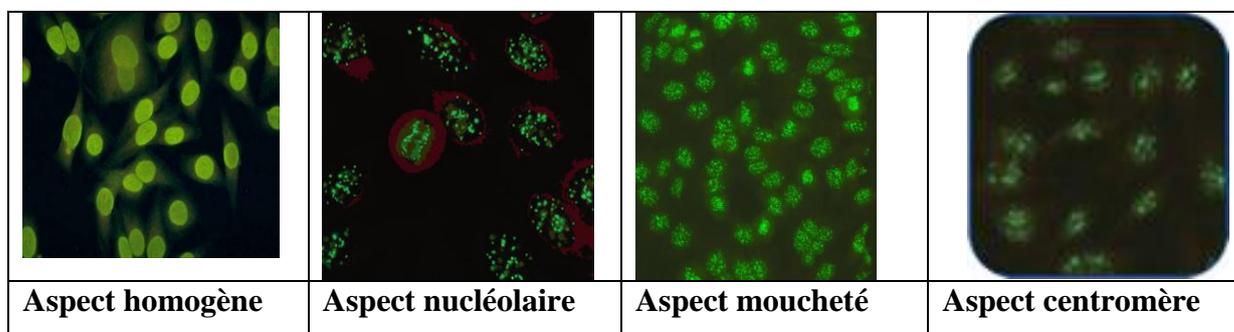


Figure 19: les aspects de la fluorescence.

Dans le cas des aspects condensé et mal visualisé nous avons réalisé d'autres dilutions (voire le tableau 1 dans l'annexe).

I.2.2. L'identification des auto-anticorps solubles par la méthode immunodot

La positivité du test de dépistage par IFI indique la présence d'anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes nucléaires (ADN natif, antigènes nucléaires solubles (SSA, SSB, Sm, RNP, Scl70, ACA)...) que l'on pourra ensuite caractériser par d'autres techniques.

Le type de la fluorescence observée et le titre des anticorps sont des éléments qui orientent le biologiste lors de la caractérisation des spécificités antigéniques reconnues dans ce cas en utilisant une autre méthode appelée immunodot qui permet l'identification des cet auto-anticorps solubles (ENA) c'est le cas des aspects moucheté.

I.2.2.1. Principe du test immunodot

Il s'agit d'un test qualitatif in vitro utilisé pour la détection des auto-anticorps humains de classe IgG, dirigés contre 14 antigènes différent: nRNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70, PM-Scl, dsDNA, Histones, Nucléosome, protéine ribosomale dans le sérum. Nous avons utilisé un Kit immunodot (EUROLINE® ANA Profil 3) pour le typage des ANA dépistés à l'IFI sur cellule Hep2000 au Hep2.

I.2.2.2. Le mode opératoire

1^{ère} étape : 1^{er} Incubation

- Remplir chaque rigole avec 1.5 ml d'échantillon de sérum dilué (Figure 20) et incuber a température ambiante (+18°C a +25°C) pendant 30 minutes sur un agitateur a bascule.

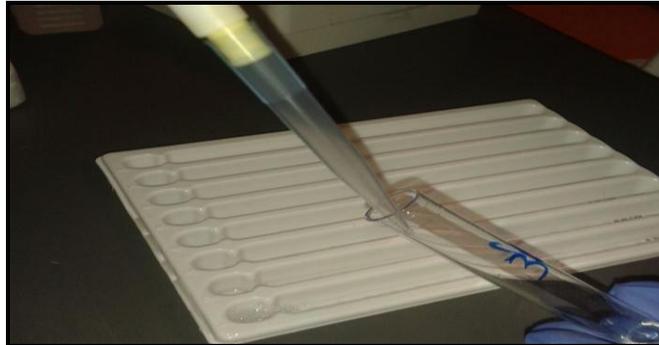


Figure 20: mettre d'échantillon de sérum dilué et bandelette.

2^{ème}: lavage

- Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole, ensuite laver sur un agitateur à bascule 3 fois pendant 5 minutes chaque rigole avec 1.5ml de tampon de lavage dilué.

3^{ème} étape : 2^{ème} incubation

- Déposer 1,5 ml de conjugué enzymatique dilué (anti-IgG humaine couplé a la phosphatase alcaline) dans chaque rigole et incuber pendant pendant 30 minutes a température ambiante (+18°C a +25°C) sur un agitateur à bascule (Figure 21).



Figure 21: incubation de la bandelette et du conjugué enzymatique dilué

4^{ème} étape : 2^{ème} lavage

- Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole et laver comme décrit ci-dessus.

5^{ème} étape : 3^{ème} Incubation

- Déposer 1,5 ml de solution de substrat dans chaque rigole du bac d'incubation. Incuber pendant 10 minutes a température ambiante (+18°C a +25°C) sur un agitateur a basculée (Figure 22).



Figure 22: incubation de bond lette avec substrat.

6^{ème} étape : arrêt

- Aspirer et éliminer le liquide de chaque rigole et laver chaque bandelette 3 fois pendant 5 minutes avec de l'eau distillée.

7^{ème} étape : évaluation

- Placer la bandelette test sur le protocole d'évaluation (Figure 23), sécher a l'air et évalue.

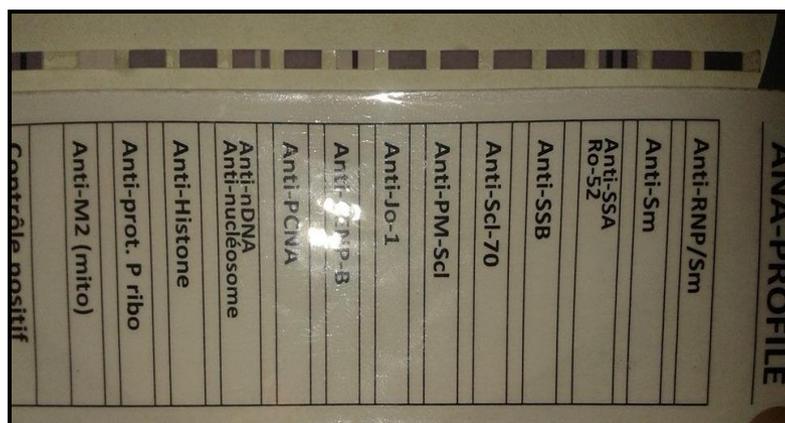


Figure 23: révélation de l'immunodot.

Dans le cas des aspects homogènes il faut faire une autre technique pour la mise en évidence des anticorps anti-ADNn, c'est la techniques appelé test de Crithidia luciliae.

I.2.3. Principe du test de Crithidia luciliae

C'est une technique d'immunofluorescence indirecte, dans laquelle les échantillons sont incubés avec l'antigène fixé sur la lame et les anticorps non liés sont éliminés au lavage. Le substrat est incubé avec un conjugué fluorescéine spécifique et le réactif non lié est ensuite éliminé au lavage. Lorsqu'ils sont vus à l'aide d'un microscope fluorescent, les échantillons ayant une réaction positive aux auto-anticorps afficheront une fluorescence vert pomme qui correspond aux zones de la cellule ou des noyaux où l'auto-anticorps s'est lié.

I.2.3.1. Le mode opératoire du test de Crithidia luciliae

1^{ère} étape: Préparation de la lame substrat

- laisser la lame atteindre la température ambiante avant de la retirer de sa pochette.
- Étiqueter la lame à l'aide d'un crayon et la placer dans une chambre humide adéquate.
- Ajouter une goutte (20 à 25 µl) du Contrôle positif non dilué et du Contrôle négatif respectivement sur les puits 1 et 2.
- Ajouter une goutte (20 à 25 µl) de l'échantillon du patient sur les puits restants.

2^{ème} étape: Incubation de la lame substrat

- incuber la lame pendant 30 minutes dans une chambre humide (un essuie-tout humide placé à plat au fond d'un récipient de plastique ou de verre fermé permet de maintenir les conditions d'humidité appropriées). Ne pas laisser le substrat se dessécher pendant la procédure d'analyse.

3^{ème} étape: 1^{er} Lavage de la lame substrat

- Après l'incubation, utiliser une pissette de plastique ou une pipette pour éliminer le sérum en rinçant délicatement avec la solution tampon PBS diluée.
- Orienter la lame et le flot de solution tampon PBS de façon à minimiser le débordement des échantillons entre les puits. Ne pas diriger le flot directement dans les puits sous peine d'abîmer le substrat.
- Si désiré, placez les lame dans une fiole de Coplin d'amortisseur dilué de PBS pendant jusqu'à 5 minutes.

4^{ème} étape Addition du conjugué fluorescent

- Eliminer l'excès de la solution PBS en secouant la lame. Replacer la lame dans la chambre humide et recouvrir immédiatement chaque puits d'une goutte de conjugué fluorescent. Incuber la lame pendant 30 minutes.

5^{ème} étape: 2^{ème} Lavage de la lame substrat

- utiliser une pissette de plastique ou une pipette pour éliminer le sérum en rinçant délicatement avec la solution tampon PBS diluée.
- Orienter la lame et le flot de solution PBS de façon à minimiser le débordement des échantillons entre les puits. Ne pas diriger le flot directement dans les puits sous peine d'abîmer le substrat.
- Si désiré, placez les lame dans une fiole de Coplin d'amortisseur dilué de PBS pendant jusqu'à 5 minutes.

6^{ème} étape: Montage

- Egoutter 10 μ L de huile à immersion (milieux de montage) elle devra être adaptée au type et à la marque de microscope utilisé.
- Mettre lamelle sur les lames.

7^{ème} étape: lecture

Il s'agit d'une analyse visuelle des lames par microscope et interprétation des résultats. Le résultat obtenu est sous forme des aspects de la fluorescence (Figure 24).



Figure 24: aspect homogène de DNAn.

Résultats

Et

Discussions

II. Résultats et discussions

II.1. Répartition des patients selon le sexe

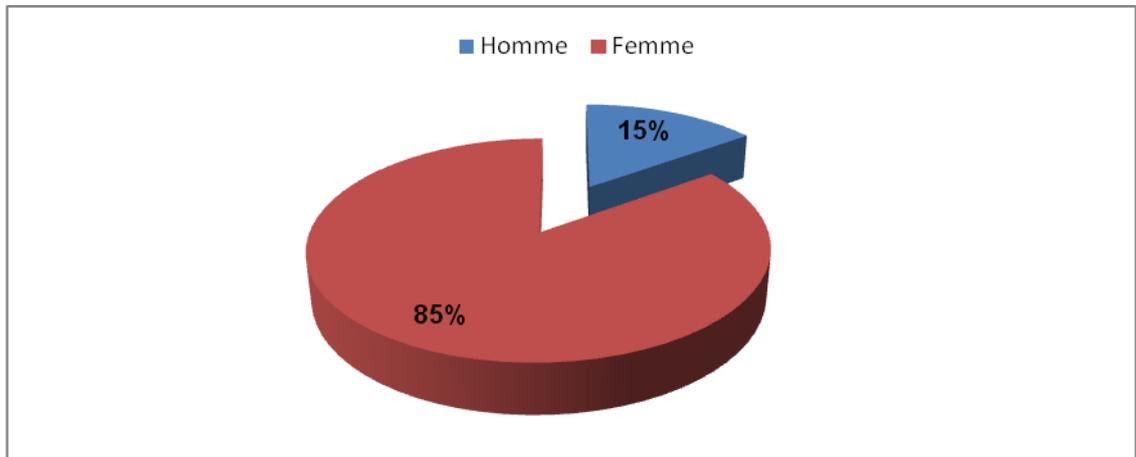


Figure 25: Répartition des patients selon le sexe.

Parmi les 40 patients représentant une maladie auto-immunes 85% sont de sexe féminin. Cela confirme que les femmes sont plus touchées que les hommes.

Ces résultats sont en accord avec l'étude de Hachulla et al, 2007, qui a retrouvé que les maladies systémiques auto-immunes touchent avec prédilection la femme, souvent en âge de procréation.

II.2. Répartition des patients selon L'âge

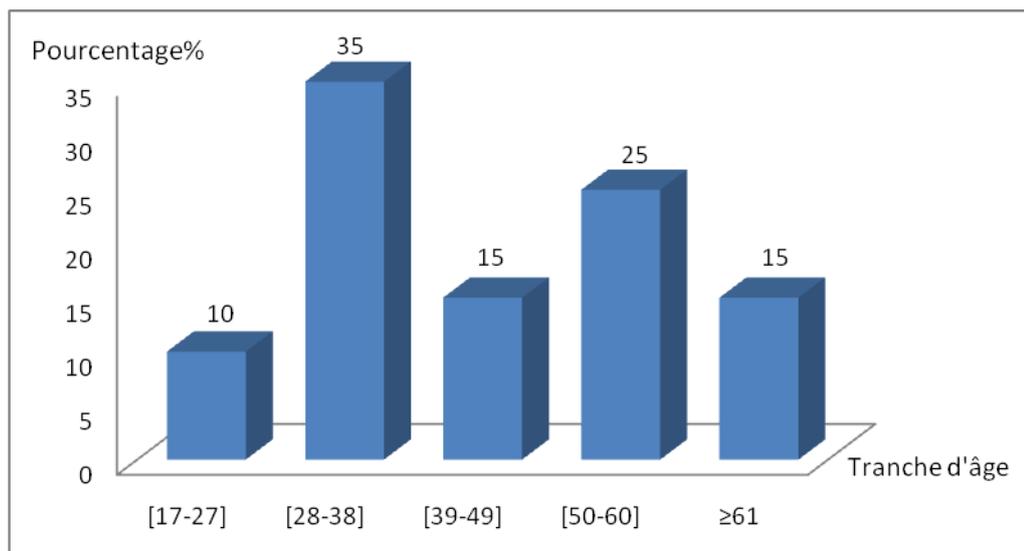


Figure 26: Répartition des patients selon la tranche d'âge.

Notre série est composée de 40 patients dont l'âge varie de 17 à 72 ans, avec une moyenne de 43.65ans et la tranche d'âge située entre 28 et 38 ans est la plus touchée avec un pourcentage de 35%. Nos résultats sont comparable avec des ceux de Abed et al, 2012 qui a trouvé d'après son étude épidémiologique que la moyenne d'âge est de 44,5. Alors que Hachulla et al, 2007, a démontré que la sclérodémie systémique (ScS) est rencontrée entre 40 et 50 ans.

II.3. Les signes cliniques

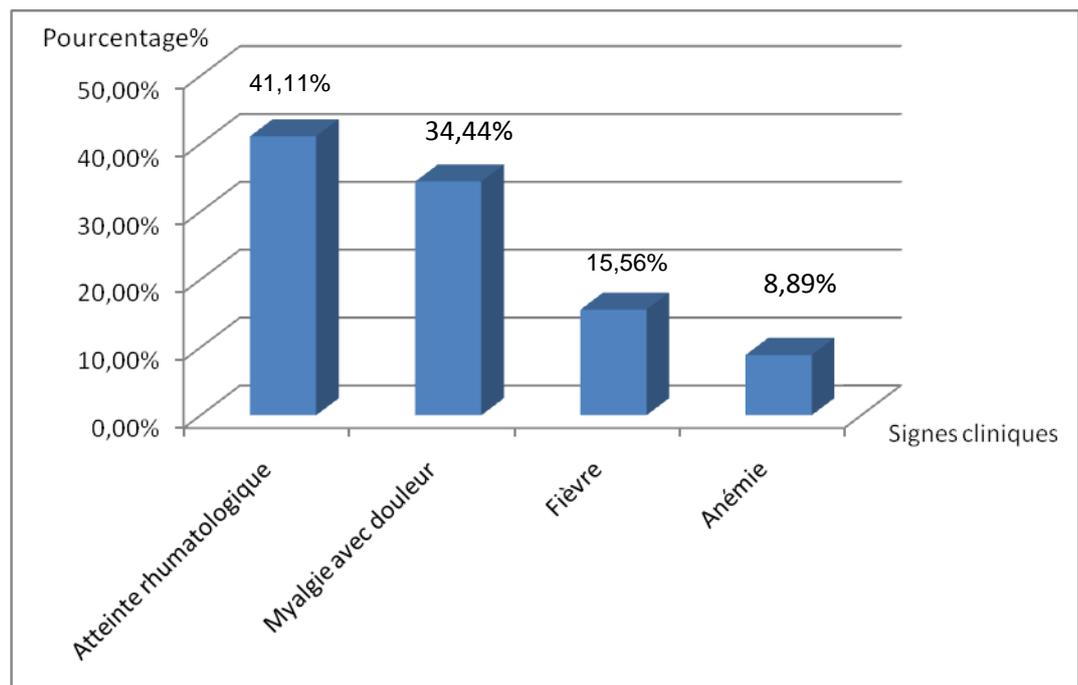


Figure 27: répartition des patients selon les signes cliniques.

L'atteinte rhumatologique a constitué l'atteinte la plus fréquente avec 41,11% des cas, suivie de la Myalgie accompagnée d'une douleur avec 34,44% des cas. Broussolle et al, 2003 a trouvé que les signes cliniques initiaux de LES sont les arthrites, la fièvre et l'anémie. Mais les atteintes articulaires restent des signes essentiels de la maladie débutante, mais avec une fréquence moins importante, confirmée au cours de l'évolution.

Les principales difficultés du diagnostic sont rencontrées avec les signes articulaires: arthrose, arthrites microcristallines, autres arthropathies inflammatoires comme la pseudopolyarthrite rhizomélique.

Selon Faedda et al, 2008, diverses manifestations rhumatologiques sont fréquentes au cours d'une sclérodémie. Les signes articulaires surviennent de façon inaugurale dans 24 % à 96 % des cas.

II.4. Répartition des patients selon le type de la maladie

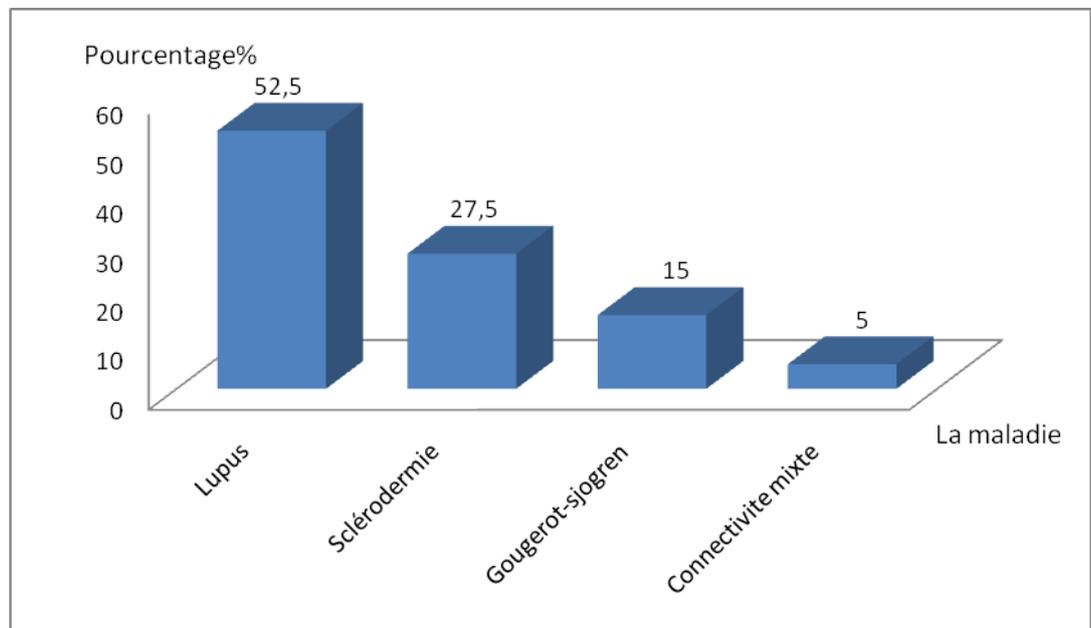


Figure 28: Répartition de patients selon le type de la maladie.

Chez notre population nous avons remarqué la présence de trois types de maladies différentes, dont le lupus est la plus représentée avec 52.5%, soit 21 cas (20 femmes et 1 homme), suivie de la Sclérodémie et le syndrome de Gougerot-sjogren avec 27.5% et 15% respectivement. Ce résultat est comparable avec celui de Louzir et al, 2002 qui dit que le lupus systémique est une maladie essentiellement de la femme adulte et touche rarement les hommes.

II.5. Le profil immunologique

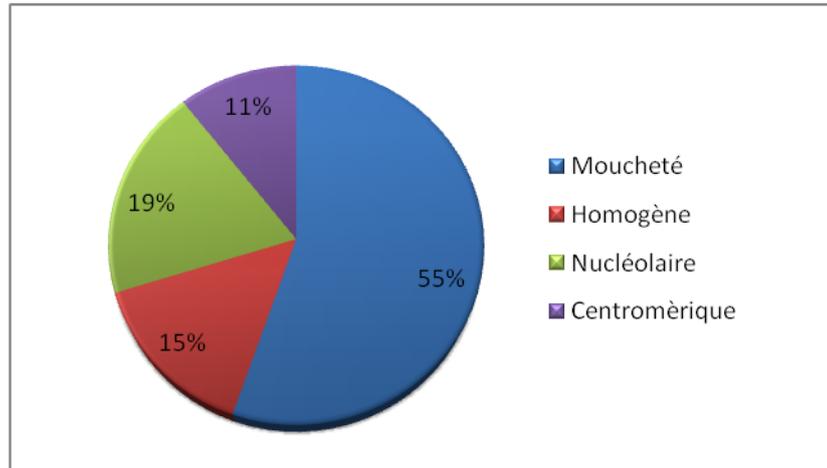


Figure 29: répartition de l'aspect des ANA.

- La recherche des ANA est réalisée par la méthode d'immunofluorescence indirect (IFI) qui permet la détection la présence d'ANA.
Cette méthode est utilisée dans l'expérience de Abed et al, 2012 qui dit que la recherche et d'identification des ANA est fréquente d'être confronté à une situation où le dépistage par immunofluorescence indirecte (IFI) détecte la présence d'ANA.
Pendant la période d'étude, 50 demandes de recherche d'ANA étaient adressées à notre laboratoire. Le dépistage de ces ANA par IFI a révélé 40 cas (80 %) des sérums positifs. Parmi ces sérums, nous avons retrouvé que l'aspect moucheté (55 %), et l'aspect nucléaire (19 %) sont les plus représentés.
- Selon André et al, 2012, une bonne analyse de l'aspect de fluorescence oriente souvent vers la spécificité de l'anticorps et vers les tests d'identification. C'est pour quoi on utilise la technique immunodot pour la recherche d'ANA solubles. Cette technique a été effectuée chez 40 patients.

II.6. La répartition des ANA selon les types des maladies

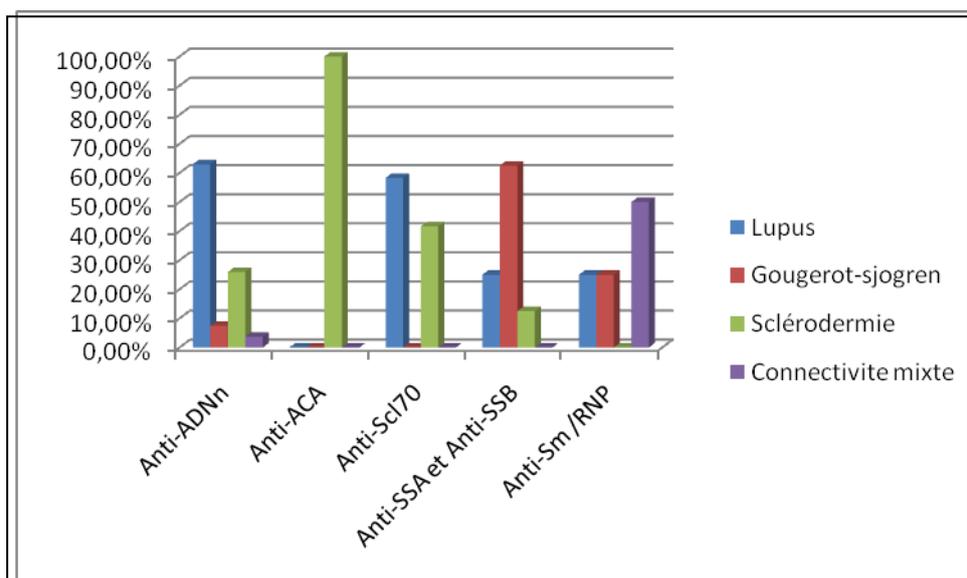


Figure 30: résultats du bilan immunologique selon la présence des ANA dans les maladies systémique.

Les anticorps anti ADN natifs étaient positifs chez des patients lupiques avec 63% et patients présentant une Sclérodermie avec 26%.

- Les anticorps Anti-ACA étaient positifs chez tous les patients présentant une Sclérodermie.

- Les anticorps Anti-Scl70 étaient positifs dans 58,33% des patients lupiques et de 41,66% des patients avec une Sclérodermie.

- Par contre, les anticorps Anti-SSA et Anti-SSB étaient positifs chez 62,5% des patients présentant un syndrome de Gougerot-sjogren et de 25% des patients lupiques.

-Pour les anticorps Anti-Sm /RNP, ils étaient positifs dans 50% des patients à une Connectivité et chez 25% des patients lupiques.

Ces résultats sont comparables avec ceux retrouvés par Sibilia et al, 2002 qui a démontré que la prévalence:

- des **anti-ADN natif** est entre 50-70% dans le cas des LES est entre 10-15% dans le cas de la Sclérodermie.
- des **Anti-Sm** est de 15-25% dans les LES.
- des **Anti-RNP** est de 10-15% dans les LES, de 95% dans la Connectivite mixte et de 5-10% dans le cas de syndrome de Gougerot-Sjögren.

- des **Anti- SS-A** dans le syndrome de Gougerot-Sjögren est de 60-80% est de 20-40% dans le cas des LES.
- des **Anti-La / SS-B** en cas d'un Syndrome de Gougerot-Sjögren est 50-70% est de 10-20% dans le cas des LES.
- des **Anti-Scl 70** dans la Sclérodémie systémique est de 30%.
- des **Anti-centromère (anti-ACA)** en cas d'un Sclérodémie est de 85%.

On peut dire donc que chaque auto-anticorps a une valeur de spécificité et de sensibilité pour chaque type de maladie auto-immune. El Hajj et al, 2009 a démontré que grâce à la spécificité de ces anticorps, les techniques de détection se sont perfectionnées et leurs rôles et leur intérêt clinique ont été précisés.

Conclusion

Conclusion

Les anticorps antinucléaires (ANA) réagissent avec divers constituants du noyau cellulaire. Leur recherche a un intérêt majeur dans le diagnostic des connectivites, mais on les rencontre aussi dans d'autres maladies inflammatoires et chez les sujets âgés. Ils constituent un groupe hétérogène d'auto-anticorps dont il importe de déterminer la spécificité pour orienter le diagnostic différentiel.

Leur détection repose sur une démarche en cascade car toute recherche d'ANA commence avec un dépistage par immunofluorescence indirecte (IFI), qui est une technique maîtresse de dépistage des auto-anticorps puisqu'elle permet la détection de la plupart des anticorps utiles au diagnostic, pronostic et suivi des maladies auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organe.

Les images de fluorescence observées donnent une première information sur l'identité de la cible. Si le dépistage est positif, il sera suivi d'une étape d'identification dont l'objectif est la caractérisation du ou des antigènes cibles reconnus par l'ANA dépisté grâce à d'autres méthodes, permettant l'identification précise de la nature moléculaire de l'antigène contre lequel est dirigé l'anticorps détecté.

La recherche d'auto-anticorps doit être confiée à un laboratoire capable de mettre en œuvre l'ensemble des techniques nécessaires à leur détection et leur identification. Tout résultat doit être interprété en fonction du contexte clinique, d'où la nécessité d'une collaboration étroite entre le médecin prescripteur et le biologiste. L'immunofluorescence indirecte reste à l'heure actuelle la technique de dépistage pour la plupart des auto-anticorps.

Références

Références

- Abed. S, Ben Ayed. M, Ben Hadj Hmida. Y, Feki. S, Frikha .F, Turki .H, al.** 2012. Prévalence et valeur diagnostique des anticorps antinucléaires de spécificité antigénique indéterminée: étude rétrospective à propos d'une série de 90 patients. *Médecine Interne*; 33:475- 481.
- Abid. M, Ayadi. H, Chabchoub. G, Maalej. A, Mnif. M, Charfi. N.** 2006. Étude épidémiologique des maladies autoimmunes thyroïdiennes dans le sud tunisien. *Annales d'Endocrinologie.* 67:591-595.
- Achour. A, Jamin. C, Olivier. J, Youinou. P.** 2014. Les lymphocytes régulateurs. Une nouvelle coopération entre cellules T et B pour un contrôle plus efficace de la réponse immunitaire. *Médicale.* 43:18-26.
- Amoura. Z, Arnaud. L, Mathian. A.** 2014. Physiopathologie du lupus systémique : le point en 2014. *Médecine Interne.* 35:503-511.
- Amoura. Z, Costedoat. N, Denjoy. I, Huong. D, Lupoglazoff. J, Vauthier. D, et al.** 2004. Outcome of pregnancies in patients with anti- SSA/Ro antibodies: a study of 165 pregnancies, with special focus on electrocardiographic variations in the children and comparison with a control group. *Arthritis Rheum.* 50:3187-94.
- André. C, Bossuyt. X.** 2012. Systèmes automatisés de lecture des images de fluorescence. *Francophone des Laboratoires.* 2012:13-15.
- Armengol. G, Bellien. J, Benhamou. Y, Gomez. E, Joannidès. R, Lévesque. H, Richard.V.** 2014. Évaluation de la fonction endothéliale au cours des maladies auto-immunes. *Médecine Interne.* 35:512-523.
- Atouf. O, Benseffaj. N, Brick. C, Essakalli. M, Ouadghiri. S.** 2012. Valeur diagnostique des auto-anticorps dans les maladies auto-immunes Immuno-analyse. *Biologie Spécialisée.* 27:233-236.
- Attia. S, Attig. C, Hamzaoui. A, Harzallah. O, Kairallah. M, Mahjoub. S, Njim. L, Zachama. A.** 2010. Le syndrome de Goujerot-Sjögren juvénile. À propos de 3 cas *Archives de Pédiatrie.* 17:1531-1534.

- Bahon-Riedinge. I, Beauvillain .C, Carrère. F, Chevailler .A.** 2002. Étude d'un test dot-blot de recherche des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles. Française des Laboratoires; 2002:49-54.
- Bahon Riedinge. I.** 2004. Détection des anti-ENA anti-SSA (52 et 60 kDa): expérience d'un laboratoire d'auto-immunité. Médecine Interne. 25:421-428.
- Beauvillain. C, Carrère. F, Chevailler. A.** 2006. Dépistage des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles. Fr Lab. 384:59–70.
- Bonaguri. C, Luisita. B, Melegari. A, Russo. A, Tommaso Trenti. G.** 2012. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence. Autoimmunity. 11:713-716.
- Bonnotte. B.** 2004. Physiopathologie des maladies auto-immunes. Médecine Interne. 2:648-658.
- Bottino. A, Di Cataldo. S, Ficarra. E, Tonti. S.** 2015. An automated approach to the segmentation of HEp-2 cells for the indirect immunofluorescence ANA test. Computerized Medical Imaging and Graphics. 40:62-69.
- Bradwell. A, Hughes. R, Karim. A, et al.** 2006. Immunofluorescent antinuclear antibody tests. Manual of molecular and clinical laboratory immunology editors (7th edition). 2006:995-1006.
- Bricaire. L, Groussin. L.** 2015. Pathologie Thyroïdiennes et grossesse Pregnancy And thyroid disorders Service d'endocrinologie, hôpital Cochin. AP-HP Université Paris. 27:203–210.
- Broussolle. C, Cathebras. P, Dupond. J, Gaujard. S, Massot. C, Ninet. J, Perrot. H, Rousset. H, Vital Durand. D.** 2003. Lupus érythémateux disséminé survenant après 65 ans Systemic lupus erythematosus with disease onset at 65 and older. Médecine interne. 24:288–294.
- Bussone. G, Mouthon. L, Kaveri S.V, Regent. A.** 2009. Auto-immunité humorale et cellulaire: de la physiologie à la pathologie. Médecine interne. 30:1-8.

- Büttner. T, Conrad. K, Hiemann. R, Krieger. T, Roggenbuck. D, Sack. U.** 2009. Challenges of automated screening and differentiation of non-organ specific autoantibodies on HEp-2 cells. *Autoimmunity*. 9:17-22.
- Cacoub. P, Domont. F.** 2014. Hépatites auto-immunes. *Médecine interne*. 35:6-10.
- Caquet. R.** 2008. Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles ou anticorps anti-ENA Anticorps antihistones. *Guide infirmier des examens de laboratoire*. 21:34-35.
- Carvajal. G, Devauchelle Pensec .V, Guellec. D, Saraux. A.** 2015. Existe-il des atteintes neurologiques spécifiques du syndrome de Sjögren primitif ?. *Rhumatisme*. 82:14-17.
- Castro. C, Gourley. M.** 2010. Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity. *J Alle Clin Immun*. 256:125-364.
- Chamoux. A, Delévaux. I.** 2013. Aumaître Stress et auto-immunité. *Médecine Interne*. 34:487-492.
- Chimica Acta. C.** 2010. Comparison of the Farr radioimmunoassay. 3 commercial enzyme immunoassays and Crithidia luciliae immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus. 411:959-964.
- Coughlin. G, Denton. C, Handler. C, Harvey. J, Lynch. B, Nihtyanova. S, Schreiber. B, Sobanski.** 2013. Connectivite mixte (syndrome de Sharp) ET hypertension pulmonaire. *Médecine Interne*. 34:45-46.
- Cotton. A, Hachulla. E, Launay. D, Lefebvre. G, Mouly. J.** 2013. Chapitre 7 Maladies systémiques et vascularites. *Imagerie Musculosquelettique*. 41:219-258.
- Daumas. A, Eraud. J, Granel. B, Hautier. A, Magalon. G, Sabatier. F.** 2013. Potentialités et intérêt du tissu adipeux dans la sclérodemie. *Médecine Interne*. 34:763-769.
- Degenne. D, Magdelaine. C, Vigneron. C.** 2006. Aspects des anticorps antinucléaires sur les cellules HEp-2. *Francophone des Laboratoires*. 2006:33-41.
- Dighiero. G, Oppezzo. P.** 2003. Autoanticorps, tolérance et auto-immunité. *Pathologie Biologie*. 51:297-304.

Dubucquoi. S, Hachulla. E. 2004. Intérêt des anticorps antinucléaires pour le diagnostic. La classification et le pronostic de la sclérodermie systémique. 25:442-7.

Dueymes. M, Guerrier. T, Jousse. S, Renaudineau. Y, Youinou. P. 2007. Anticorps anti- α -actinine et anticorps anti-C1q: deux nouveaux « marqueurs » pour la glomérulonéphrite lupique. Immuno-analyse et biologie spécialisée. 22:195–201.

Duhamel. A, Hachulla. E, Launay. D, Reumaux. D, Schmidt. J, al. 2010. Comparison of the Farr radioimmunoassay. 3 commercial enzyme immunoassays and Crithidia luciliae immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus. 411:959-964.

Edwards. A, Ollier. W, Perry. I. A, Spector. T. D, Silmana. J, Thompson. p. W. 1989. Free and serum testosterone levels in 276 males: a comparative study of rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and healthy controls. Clin Rheumatol. 8:37-41.

El Hajj. G, Fadlallah, Halaby. Medlej. R, Sebaaly. G, Souaid. M, Yahya. A. 2009. Maladies thyroïdiennes auto-immunes. Corrélations cliniques et biologiques. 57:218-225.

Emile. C. 2010. Quand demander les auto-anticorps dans les maladies systémiques. Comment les interpréter. 443:14-5.

Eriksson. C, Johansson. M, Kokkonen. H, et al. 2011. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: Revisited. Indian Journal of Rheumatology. 6:138-142.

Ernerudh. J, Nilsson. B, Skogh. T, et al. 2006. Antinuclear antibodies in the oldest-old women and men. J Autoimmun. 27:281-8.

Eymard. B. 2014. La myasthénie du côté de l'interniste. Médecine Interne. 35:421-429.

Faedda. R, Fenu. P, Luca Erre. G, Marongiu. A, Masala. A, Sanna. M. 2008. La main sclérodermique : signes cliniques et radiologiques. Rhumatisme. 75:607-612.

Fauchais. A, Jauberteau. M, Martel. C, Vidal. E. 2014. Physiopathologie Du syndrome de Gougerot-Sjögren Primitif. Pathophysiology Of primary Sjögren's syndrome. 35:524-530.

- Foggia. P, Percannella. G, Soda. P, Vento. M.** 2013. Benchmarking HEp-2 cells classification methods. *IEEE Trans Med Imaging.* 32:1878–1889.
- Goetz. J.** 2005. Marqueurs biologiques anciens et modernes du lupus érythémateux systémique. *Rhum Ed Fr.* 72:134-41.
- Goetz. J.** 2012. Conduite à tenir devant la mise en évidence d'anticorps antinucléaires sur HEp-2. *Francophone des Laboratoires.* 2012:7-11.
- Hachulla. E, Launay. D.** 2007. Complications maternelles graves des maladies systémiques auto-immunes *Réanimation.* 16:393-402.
- Hamann. D, Smeenk. J.** 2014. Chapter 22 – d sDNA Autoantibodies. *Autoantibodies (Third Edition).* 21:185-193.
- Harb. A, Jeddi. M, Guedira. I, Chemli. J, Korbi. S, Yacoubi. T.** 2004. Connectivite mixte révélée par une méningite lymphocytaire chronique chez un nourrisson. *Archives de Pédiatrie.* 11:126-129.
- Huck. S, Zouali. M.** 1996. Facteurs liés au sexe et pathologies auto-immunes. *Annales de l'Institut Pasteur / Actualités.* 7:143-146.
- Iannello .G, Onofri. L, Soda. P.** 2011. A decision support system for *Crithidia Luciliae* image classification. *Artificial Intelligence in Medicine.* 51:67-74.
- Laforgue. D.D, Timsit. J.** 2000. Diabète de type 1 et environnement. *D'immunologie clinique;* 16:1045-50.
- Lerner. A. Shaoul. R.** 2007. Associated autoantibodies in celiac disease. *Autoimmunity.* 6:559-565.
- Liu. L, Wang. L.** 2014. HEp-2 cell image classification with multiple linear descriptors. *Pattern Recognition.* 47:2400-2408.
- Louzir. B, Othmani. S.** 2002. Lupus systémique chez 24 hommes tunisiens: analyse clinicobiologique. *Médecine Interne.* 23:983-990.

Madsen. H, Forslid. J, Wiik AS .M, et al. 2010. Antinuclear antibodies. A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. 35:276-90.

Meroni. P, Schur. P. 2010. ANA screening: an old test with new recommendations. Ann Rheum Dis. 69:1420-2.

Meyer. O. 2010. Lupus et syndrome des anticorps antiphospholipides. Critères de diagnostic et de suivi. 77:82-8.

Percannella. G, Soda. P, Vento. M. 2011. Mitotic cells recognition in HEp-2 images. Pattern Recognition Letters. 45:136-144.

Renaudineau. Y, et Younioun. P. 2006. LES nouveaux autoanticorps du syndrome de Gougerot-sjogern primaire New autoantibodies in Gougerot-sjogern. Immuno-analyse et biologie spécialisée. 21:158-164.

Sibilia. J. 2002. Auto-anticorps. Intérêt diagnostique et pronostique en réanimation médicale Réanimation. 11:349-358.

Subra. J. 2004. Silice et auto-immunité. Française des Laboratoires. 2004:23-25. **Tron. F.** 2014. Les auto-anticorps comme biomarqueurs. La Presse Médicale. 43:57-65.

Wémeau. J. 2014. Chapitre 15: Le diabète de type 1 Endocrinologie. Diabète, Métabolisme et Nutrition pour le Praticien. 36:215-225.

Annexe

L'annexe

Tableau 1: Les dilutions initiales des sérums

Cellules, organes ou substrats utilisé	Auto-anticorps recherches	Dilution initiale
--	---------------------------	-------------------

Cellules Hep2 ou Hep 2000	Anti-nucléaires	1/80
---------------------------	-----------------	------

Dilution	Exemples :	
1/80	10 µl du sérum+790 µl du PBS	25 µl du s sérum+1975 µl du PBS
1/160	100 µl de la dilution 1/80+ 100 µl du PBS	
1/320	100 µl de la dilution 1/160 +100 µl du PBS	100 µl de la dilution 1/80+ 300 µl du PBS
1/640	100 µl de la dilution 1/320 +100 µl du PBS	100 µl de la dilution 1/80+ 700 µl du PBS
1/1000	Faire la dilution 1/100 : 10 µl sérum + 990 µl du PBS. Puis : 100 µl de la dilution 1/100 + 900 µl du PBS	

Tableau 2: Réactifs communs de la méthode IFI

Déscription	Format
Lames, contenant chacune 14 puis avec des cellules Hep 2000 humaine	10 lames
Anti-IgG humaine couple a la FITC (chèvre),prêt a l'emploi	1 x 1,5 ml
Contrôle positif :autoanticorps anti-nucléaire humain, prêt a l'emploi	1 x 0,1 ml
Contrôle négatif : négatif en autoanticorps, humain, pert a l'emploi	1 x 0,1 ml
Sel pour PBS pH 7,2	2 sachets
Tween 20	2 x 2,0 ml
Milieu d'inclusion, prêt a l'emploi	1 x 3,0 ml

Tableau 3: Composition du coffret de méthode ANA profile

Composition	Format
Bandelettes tests coatées avec les antigènes : nRNP, Sm, SS-A, SS-	16 bandelettes

B, Scl-70, PM-Scl, dsDNA, Histones, Jo-1, Nucléosome, protéine P ribosomale et AMA-M2, PCNA, CENP B	
Contrôle positif , (IgG, humain), concentré 100X	1x 0,02 ml
Conjugué enzymatique Anti-IgG Humaine couplé a la phosphatase alcalin (chèvre), concentré 10x	1x3 ml
Tampon échantillon , prêt a l'emploi	1x100 ml
Tampon de lavage , concentré 10x	1x50 ml
Solution de substrat Nitrobleutetrazoliumchloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (NBT/BCIP), prêt à l'emploi	1x30ml
Bac d'incubation	2x8 rigoles

Résumé

Ce travail repose sur une étude descriptive et analytique réalisée au sein du laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire Constantine (HMRUC) entre 20 Avril et 20 Mai 2015. En plus de la recherche des maladies auto-immunes systémiques chez 40 patients, une recherche d'anticorps antinucléaires (ANA) a été réalisée chez 50 patients, parmi lesquels 40 patients sont ANA positives.

Nous avons constaté que la tranche d'âge située entre 28 et 38ans est la plus touchée par les MAI et touchant beaucoup plus les femmes (85%). Elles sont marquées par la présence des atteintes rhumatologiques qui constituent les signes cliniques les plus fréquentés avec 41,11% des cas, suivie de la Myalgie accompagnée d'une douleur avec 34,44% des cas.

Le lupus systémique est une maladie essentiellement de la femme adulte et touche rarement les hommes, cela a été confirmé par notre étude dans laquelle nous avons retrouvé 20 femmes lupique et un seul homme.

L'immunofluorescence indirecte (IFI) représente la technique maîtresse de dépistage des auto-anticorps puisqu'elle permet la détection de la plupart des anticorps utiles au diagnostic, pronostic et suivi des maladies auto-immunes spécifiques et non spécifiques d'organe. Si le dépistage est positif, il se poursuit par une étape d'identification des antigènes cibles reconnus par l'ANA dépisté par la méthode **immunodot**.

Mots de clés: Anticorps antinucléaires, maladie auto-immune systémique, immunofluorescence indirecte, immunodot, auto-anticorps.

This work is based on a descriptive and analytical study conducted in the laboratory of immunology Regional 1'Hôpital Military University Constantine (HMRUC) between 20 April and 20 May 2015. In addition to research systemic autoimmune disease in 40 patients, antinuclear antibody (ANA) was performed in 50 patients, including 40 patients are positive ANA.

We found that the age group between 28 and 38 years is the most affected by the MAI and affecting more women (85%). They are marked by the presence of rheumatic attacks which are the busiest clinical signs with 41.11% of cases, followed by myalgia accompanied by pain with 34.44% of cases.

Systemic lupus is a disease primarily of adult women and rarely affects men; this was confirmed by our study in which we found 20 lupus women and one man.

Indirect fluorescent antibody (IFA) is the centerpiece of technical screening since autoantibodies allows the detection of most of the antibodies useful in the diagnosis, prognosis and monitoring of specific autoimmune diseases and organ nonspecific. If the screening is positive, it is followed by a step of identifying the target antigens recognized by the ANA detected by immunodot method.

Key words: antinuclear antibodies, systemic autoimmune disease, indirect immunofluorescence, immunodot, autoantibodies.

يستند هذا العمل على دراسة وصفية وتحليلية أجريت في مختبر علم المناعة بالمستشفى العسكري قسنطينة ما بين 20 أبريل و 20 ماي 2015. و البحث عن أمراض المناعة الذاتية لدى 40 مريضا ، و قد أجريه البحث على 40 مريضا يعانون من مرض المناعة الذاتية حيث تم البحث عن الاجسام المضادة (ANA) لدى (50) مريضا من بينهم 40 مريضا ذو إيجابية.

وجدنا أن الأمراض الذاتية تصيب عدد كبير من النساء (85%) مقارنة بالرجال. كما أن الفئة العمرية الممتدة ما بين 28 و 38 عاما هي الفئة الأكثر تضررا و تكون مصحوبة بأعراض كالآم الروماتيزمية بنسبة 44,11% ، تليها ألم عضلي بنسبة 34,44%.

الذئبة الحمراء هو مرض يصيب في المقام الأول النساء البالغات، ونادرا ما يصيب الرجال، هذا ما أكدته النتيجة المتحصل عليها من خلال بحثنا وجود 20 امرأة مصابة بالذئبة الحمراء مقابل رجل واحد فقط.

و كسبيل للكشف عن الأجسام المضادة (ANA) قمنا باستعمال تقنية IFI لتشخيص أمراض المناعة الذاتية هي تقنية تسمح بالكشف عن معظم الأجسام المضادة المستعملة في رصد امراض المناعة الذاتية. فإذا كان الفحص إيجابيا يتبع بخطوة لتحديد المستضدات المتعرف عليها من قبل بطريقة icul aidihtirclia أو todonummi.

الكلمات المفتاحية:

الاجسام المضادة, أمراض المناعة الذاتية النظامية, الذئبة الحمراء, IFI, المستضدات .