



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



## PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques

Sciences Biologiques appliquées et Santé

### Profil des anticorps anti-nucléaires des patients consultant à l'institut pasteur du Maroc

Présenté par :  
CHAKAR Charki

Encadré par :  
Pr A.TAZI (FST Fès)  
Dr A.BOUAYAD (IPM Casablanca)

Soutenu le : 16 juin 2015 Devant le jury composé de :

Pr A.TAZI (FST Fès)  
Pr S.SEFRIOUI (FST Fès)  
Dr A.BOUAYAD (IPM Casablanca)

Président  
Examinatrice  
Encadrant

Stage réalisé à l'unité d'immunopathologie de l'institut pasteur du Maroc

# Dédicace

*A ma mère, à mon père, symbole de l'affection, qui m'ont toujours soutenue, accordé leur amour et leur attention. Qu'ils veuillent me pardonner pour leurs sacrifices.*

*A ma sœur, pour son dévouement et son encouragement.*

*Aux membres de ma famille pour leur disponibilité*

*A tous mes professeurs, pour leurs efforts et leurs conseils*

*A mes amis, pour leur aide et leur fidélité.*

*Veillez accepter ici le témoignage de ma gratitude si grande qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de votre bienveillance et de votre dévouement.*



# Remerciements

*Il m'est agréable de m'acquitter d'une dette de reconnaissance auprès de toutes les personnes qui m'ont soutenue et qui sont intervenues dans la réussite de ce projet.*

*Au terme de mon stage de fin d'études, j'exprime mes remerciements à Mr Abdelali TAZI pour son encadrement pédagogique et pour l'intérêt avec lequel il a suivi la progression de mon travail, pour ses conseils efficaces et ses directives tout au long de ma période de stage.*

*Ma gratitude s'adresse également à Mr Abdellatif BOUAAÏAD mon encadrant professionnel pour m'avoir donné l'opportunité de passer ce stage de fin d'études dans des conditions favorables et pour le temps qu'il m'a consacré, sachant répondre à toutes mes interrogations.*

*Merci à tous le corps professoral de la F ST –Fès et à tous les agents de l'IPM – Casablanca qui ont contribué directement ou indirectement à l'aboutissement de mon projet.*

*Je tiens également à remercier Mme le professeur Samira SEFRIOUI d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Enfin, je ne peux clôturer cette page de remerciement sans évoquer mes parents, mon frère, ma sœur, mes amis et tous ceux qui, de près ou de loin.*

*Merci*

# Liste des tableaux

**Tableau 1** : Maladies auto-immunes spécifiques d'organes

**Tableau 2** : Mécanismes lésionnels des auto-anticorps

**Tableau 3** : Fréquence des anticorps anti-nucléaires dans différentes maladies auto-immunes systémiques

**Tableau 4** : L'aspect de la fluorescence en fonction des antigènes cibles et les pathologies associées

**Tableau 5** : Présence des anticorps anti-ADN chez quelques patients même si le dépistage par immunofluorescence indirect est négatif

# Liste des figures

- Figure 1** : Tolérance centrale
- Figure 2** : Fluorescence d'aspect homogène des AAN sur cellules Hep-2
- Figure 3** : Fluorescence d'aspect mouchetée à gros grains sur cellules Hep-2
- Figure 4** : fluorescence d'aspect mouchetée à grains fins sur cellules Hep-2
- Figure 5** : fluorescence d'aspect nucléolaires des AAN sur cellules Hep-2
- Figure 6** : Fluorescence mixte nucléaire homogène et nucléolaire
- Figure 7** : Fluorescence nucléaire mixte mouchetée et nucléolaire
- Figure 8** : Exemple de résultats obtenus et de la courbe d'étalonnage
- Figure 9** : Lames de substrats sensibilisées par Hep-2
- Figure 10** : Bandelettes sensibilisées contre les anti-ECT
- Figure 11** : Répartition des patients selon le sexe
- Figure 12** : Répartition des patients selon l'âge
- Figure 13** : Répartition des patients selon l'aspect de la fluorescence
- Figure 14** : Répartition en fonction de la nature de l'anticorps
- Figure 15** : Répartition selon la positivité de l'IFI

# Liste des abréviations

<b>AAN</b>	: Anticorps Anti-nucléaire
<b>Ac</b>	: Anticorps
<b>ADCC</b>	: Cytotoxicité cellulaire dépendante des Anticorps
<b>ADNn</b>	: Acide désoxyribonucléique natif
<b>Ag</b>	: Antigène
<b>ARNt</b>	: Acides ribonucléiques de transfert
<b>BCR</b>	: Récepteur des cellules B
<b>CD</b>	: Marqueur de différenciation
<b>CMH</b>	: Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>Do</b>	: Densité optique
<b>ECT</b>	: Extrait de cellules thymiques
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FITC</b>	: Fluorescein isothiocyanate
<b>HLA</b>	: Human Leukocyte Antigen
<b>IFI</b>	: Immunofluorescence Indirect
<b>Ig</b>	: Immunoglobuline
<b>IL</b>	: Interleukine
<b>IPM</b>	: Institut Pasteur du Maroc
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>LB</b>	: Lymphocyte B
<b>LED</b>	: Lupus érythémateux disséminé
<b>LES</b>	: Lupus érythémateux systémique
<b>LT</b>	: Lymphocyte T
<b>LTh</b>	: Lymphocyte T helper
<b>MAI</b>	: Maladie auto-immune
<b>PBS</b>	: Tampon phosphate salin
<b>RIA</b>	: Radioimmunoassay
<b>TCR</b>	: Récepteurs de type Toll
<b>TLR</b>	: Récepteur des cellules T
<b>UI</b>	: Unité internationale
<b>UV</b>	: Ultraviolet
<b>VIH</b>	: Virus de l'immunodéficience humaine

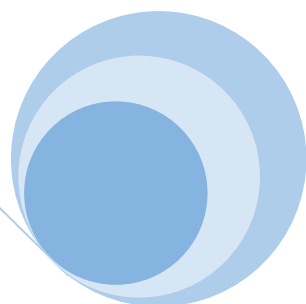
# Sommaire

	page
<b>Objectif du travail</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>2</b>
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>I. Définition de l'auto-immunité</b>	<b>3</b>
<b>II. Classification des maladies auto-immunes</b>	<b>3</b>
1. MAI systémiques (non spécifiques d'organes)	3
2. MAI spécifiques d'organes	3
<b>III. PHYSIOPATHOLOGIE des MAI</b>	<b>4</b>
1. Mécanismes du maintien de la tolérance	4
1.1. La tolérance centrale des LT	4
1.2. La tolérance périphérique des LT	6
1.3. La tolérance centrale des LB	6
1.4. La tolérance périphérique des LB	6
2. Mécanismes à l'origine de la rupture de la tolérance	6
3. Physiopathologie des MAI	7
3.1. Facteurs prédisposant	7
3.2. Mécanismes lésionnels des MAI	7
3.2.1. Lésions médiées par les auto-anticorps	7
3.2.2. Lésions associées aux lymphocytes T	8
<b>IV. Les Anticorps anti-nucléaires</b>	<b>9</b>
1. Définition	9
2. Les anticorps spécifiques d'acides nucléiques et de nucléoprotéines	10
2.1 Anticorps anti-ADN natif	10
2.2 Anticorps anti-histones	10
2.3 Anticorps anti-nucléosomes	10
3. Les anticorps spécifiques d'antigènes nucléaires solubles (anti-ECT)	11
3.1. Anticorps anti-Sm	11
3.2. Anticorps anti-U1RNP	11
3.3. Anticorps anti-Ro/SSA	11
3.4. Anticorps anti-La/SSB	12
3.5. Anticorps anti-PCNA	12
3.6. Anticorps anti-Ma	12
3.7. Anticorps anti-Jo1	12
3.8. Autres anticorps anti-synthétases	13
3.9. Anticorps anti-PM/Scl	13
3.10. Anticorps anti-Ku	13
3.11. Anticorps anti-PM1	13
3.12. Anticorps anti-SRP	14

3.13.	Anticorps anti-Mi-2	14
3.14.	Anticorps anti-Scl 70	14
3.15.	Les anticorps dirigés contre des constituants du centromère	14
V.	<b>Les techniques de mise en évidence des anticorps anti-nucléaires</b>	15
1.	Dépistage par l'immunofluorescence indirecte (IFI)	15
1.1.	Principe	15
2.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	15
2.1.	Principe	15
3.	Immuno-dot	15
3.1.	Principe	15
VI.	<b>Démarche diagnostique</b>	16
1.	Recherche des Anticorps anti-nucléaire sur HEP-2	16
1.1.	Choix de conjugué et de la dilution	16
1.2.	Aspects de fluorescence et corrélations cliniques	16
<b>Matériel et méthodes</b>		
I.	Population étudiée	19
II.	Matériel et méthodes	19
1.	Dosage du anti-ADN natif par ELISA	19
2.	Dosage et titrage des anticorps anti-nucléaires par IFI	21
3.	Identification des anticorps anti-nucléaires solubles (Anti-ECT) par l'immuno-dot	22
<b>Résultats et discussion</b>		
III.	Résultats	24
1.	Répartition selon le sexe	24
2.	Répartition selon l'âge	24
3.	Répartition des patients selon l'aspect de la fluorescence	25
4.	Répartition selon le type de l'anticorps	26
5.	Analyse par immunofluorescence indirect et ELISA (cas particuliers)	27
6.	Comparaison des titres de l'anti-ADN	29
IV.	Discussion	30
<b>Conclusion</b>		31
<b>Références Bibliographiques</b>		32



# Présentation de la structure d'accueil



## Présentation de la structure d'accueil

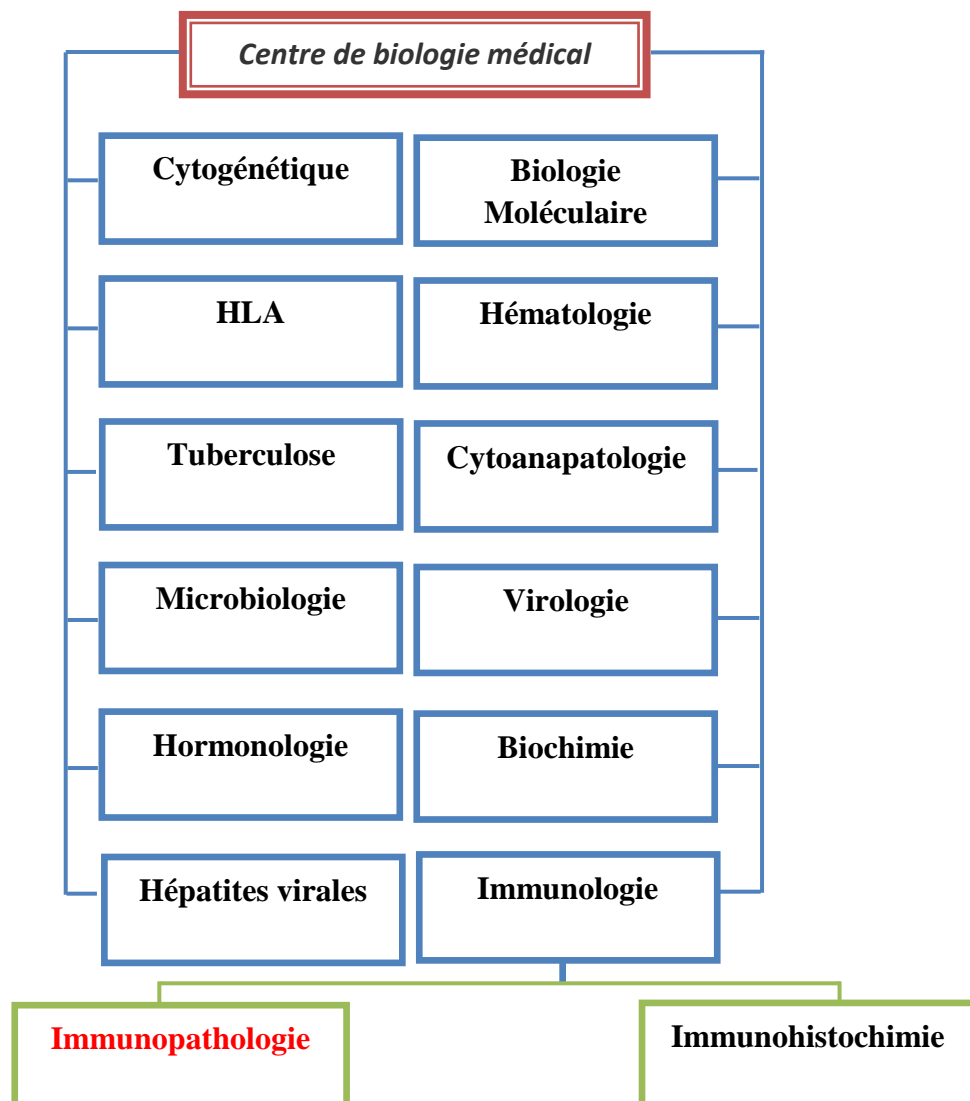
Ce mémoire a été réalisé au cours du stage de fin d'étude dans le cadre de **Licence en Sciences biologiques appliquées et santé** organisée par la faculté des sciences et techniques Fès sous la responsabilité du **Pr. A.TAZI**

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire d'immunopathologie dans un établissement de renommée nationale et internationale, c'est l'Institut Pasteur du Maroc,

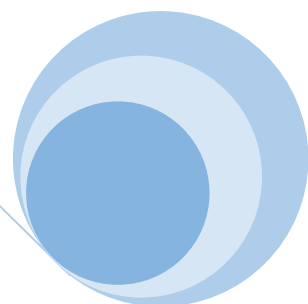
### Organisation de l'IPM

L'IPM se répartissent sur 5 départements :

- **Département de centre de biologie médical.**
- Département de la recherche scientifique.
- Département de la production pharmacologique et biologique.
- Département de sécurité alimentaire.
- Département administratif.



# Objectif du travail

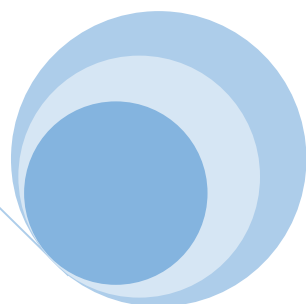


## **Objectif du travail**

Notre étude est une analyse rétrospective du profil des anticorps anti-nucléaires portant sur 105 patients ayant demandé l'analyse au service d'immunopathologie de l'institut Pasteur du Maroc à Casablanca, entre le 01 mai 2013 et le 31 juin 2014, en utilisant les techniques de dépistage par l'immunofluorescence indirecte, ELISA et l'immuno-dot.



# Introduction



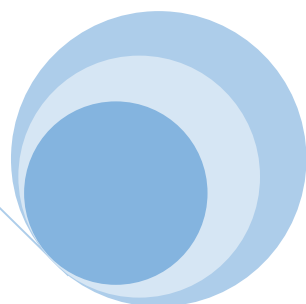
## **Introduction générale**

L'auto-immunité est la rupture des mécanismes de tolérance qui conduit à l'action pathogène du système immunitaire vis-à-vis de constituants naturels de l'organisme et à l'apparition d'une maladie dite auto-immune.

Les maladies auto-immunes représentent la 3ème cause de morbidité après les affections cardio-vasculaires et oncologiques ; elles sont caractérisées par une association à des degrés divers de signes ou de symptômes systémiques. La présence ou non d'anticorps anti-nucléaires a une grande importance, de même que leurs caractéristiques.

Les auto-anticorps antinucléaires sont dirigés contre une large variété d'auto-antigènes appartenant exclusivement ou non au noyau cellulaire, comme des protéines ou des acides nucléiques. Seule une partie de ces anticorps a une valeur diagnostique et/ou pronostique. Leur détection fait appel à des techniques variées. L'interprétation des résultats doit être prudente et tenir compte du contexte clinique et biologique.

**Revue  
bibliographique**





## V. Définition de l'auto-immunité

L'auto-immunité est une réponse immunitaire dirigée contre un antigène ou des antigènes du soi. Les maladies auto-immunes (MAI) représentent l'expression pathologique du phénomène d'auto-immunité. Il est légitime de penser que des défaillances au niveau des différents mécanismes d'induction de tolérance centrale et/ou périphérique conduisent à l'émergence de lymphocytes T et B auto-réactifs et donc, à la possibilité de développer des manifestations auto-immunes. Dans ce cas, un défaut constitutionnel unique dans l'expression thymique des auto-Ag et donc, dans le processus de sélection négative des clones T auto réactifs aboutit à l'induction d'un syndrome « multi-auto-immun ».

Les maladies auto-immunes sont des maladies multifactorielles (terrain génétique prédisposant, facteurs environnementaux, facteurs hormonaux), mais d'étiologie inconnue dans la majorité des cas.

La rupture de tolérance au soi du système immunitaire conduit à l'activation de lymphocytes B et T auto-réactifs entraînant la production d'anticorps ou de cellules effectrices reconnaissant des constituants de l'hôte et responsables de lésions cellulaires et tissulaires. Différents mécanismes physiopathologiques sont impliqués dans les maladies auto-immunes.

## VI. Classification des maladies auto-immunes

### 7. MAI systémiques (non spécifiques d'organes)

La distribution des auto-antigènes est ubiquitaire et où la formation de complexes immuns circulants aboutit à une maladie systémique avec des atteintes diffuses et polymorphes.

Exemple :

- Lupus érythémateux disséminé ;
- Polyarthrite rhumatoïde ;
- Anémies hémolytiques, leucopénies et thrombopénies auto-immunes ;
- Sclérodermie ;
- Dermatomyosite, polymyosite.

### 8. MAI spécifiques d'organes

Dans lesquelles les anticorps ou les lymphocytes T sont dirigés contre des antigènes restreints à une distribution tissulaire ou à un organe (**Tableau 1**).

**Tableau 1 : Maladies auto-immunes spécifiques d'organes**

<b>Spécifiques d'organe</b>	<b>Organe cible</b>
Thyroïdites Maladie de Basedow Hypoparathyroïdie Maladie d'Addison Diabète de type 1 Certains hypogonadismes	GLANDES ENDOCRINES
Anémie de Biermer Maladie de Crohn	TRACTUS GASTRO-INTESTINAL
Myasthénie Rhumatisme articulaire aigu Syndrome de Lambert-Eaton	MUSCLE
Sclérose en plaques Syndrome de Guillain-Barre	SYSTEME NERVEAUX
Syndrome de Goodspature	REIN
Pemphigus Maladies bulleuses auto-immunes sous-épidermiques Vitiligo Pelade Psoriasis	PEAU
Hépatites aiguës Hépatites chroniques actives Cirrhose biliaire primitive	FOIE

## **VII. PHYSIOPATHOLOGIE des MAI**

### **4. Mécanismes du maintien de la tolérance**

#### **4.1. La tolérance centrale des LT**

Le répertoire lymphocytaire T exprimé en périphérie résulte des mécanismes de sélection positive et sélection négative qui ont lieu dans le thymus. La sélection positive est un processus destiné à favoriser la survie et l'expansion des thymocytes qui reconnaissent les peptides du soi complexés aux molécules du CMH exprimées par les cellules épithéliales de la corticale thymique. La sélection négative a pour but d'éliminer les cellules fortement réactives

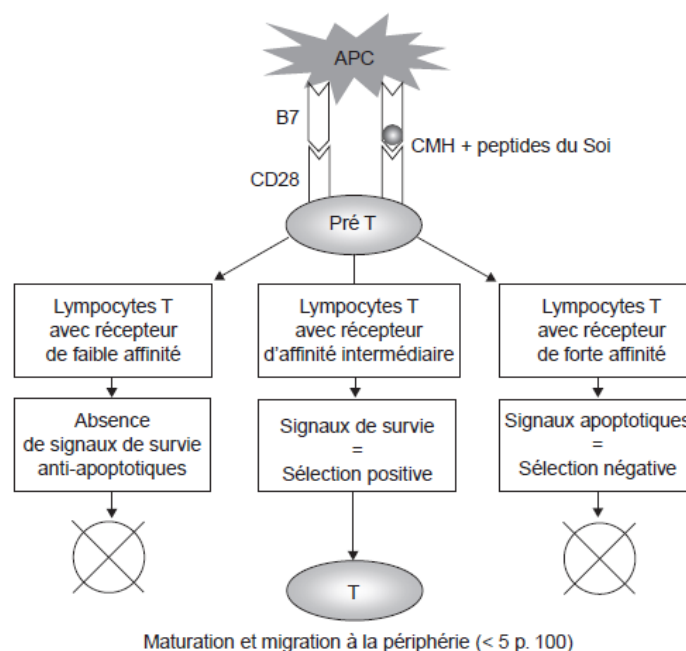
vis-à-vis des peptides du soi présentés par les molécules du CMH qui sont exprimées par les cellules épithéliales de la médullaire thymique et les cellules dendritiques.

Le mécanisme physiologique de la tolérance T est la mort dans le thymus des lymphocytes T auto-réactifs, c'est-à-dire dont les récepteurs reconnaissent les antigènes du soi. En effet, la majeure partie des lymphocytes T immatures générés dans la moelle osseuse meurent dans le thymus, sous l'influence d'une double sélection, positive et négative. Dans le thymus ces lymphocytes T, ou thymocytes, vont être en contact avec les peptides du soi présentés par les cellules dendritiques thymiques. Schématiquement trois cas de figure peuvent être distingués (**Figure 1**) :

1) ceux dont le récepteur T a une faible affinité pour les peptides du soi ne vont pas générer de signaux anti-apoptotiques de survie et de différenciation et vont mourir (absence de sélection positive) ;

2) ceux qui, au contraire, ont un récepteur de forte affinité pour les peptides du soi (auto-antigènes), vont s'activer, générer des signaux apoptotiques et mourir (sélection négative) ;

3) seuls ceux qui ont un récepteur d'affinité intermédiaire vont recevoir des signaux anti-apoptotiques de survie (sélection positive), subir une maturation et migrer à la périphérie [1].



**Figure 1 : Tolérance centrale**

## **4.2. La tolérance périphérique des LT**

Tous les antigènes du soi ne sont pas représentés au niveau du thymus. D'autre part, un certain nombre de lymphocytes T échappent à la sélection thymique négative et pourraient induire des réactions auto-immunes en l'absence de mécanismes de tolérance périphérique.

Ces mécanismes sont schématiquement au nombre de cinq :

- L'ignorance immunologique ;
- L'anergie ou paralysie lymphocytaire ;
- L'apoptose ou sélection clonale ;
- La suppression par régulation négative ;
- Equilibre de la balance TH1/TH2.

## **4.3. La tolérance centrale des LB**

La tolérance centrale des LB se fait dans la moelle osseuse et on peut donc avoir, comme pour les LT, une étape de sélection négative où les LB portant un BCR spécifique d'un auto-antigène pour lequel ils ont une très forte affinité vont être éliminées.

Il existe une autre étape qu'on appelle « Receptor Editing » : des recombinaisons géniques vont modifier le BCR et le conduire à changer de spécificité (si au départ ce récepteur était spécifique d'un auto-antigène).

## **4.4. La tolérance périphérique des LB**

Au niveau périphérique, la prolifération et la différenciation des cellules B en plasmocytes nécessitent que celles-ci reçoivent deux signaux, l'un de l'Ag se liant au BCR et l'autre des cellules T auxiliaires. Les lymphocytes T peuvent délivrer leur message par le ligand de CD40 exprimé à leur surface et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-21. L'absence du deuxième signal, conduit à l'arrêt du programme de différenciation voire à la mort cellulaire du lymphocyte B [2]. Récemment, le rôle des TLR exprimés à la surface des cellules B a été démontré dans l'activation du lymphocyte B [3].

## **5. Mécanismes à l'origine de la rupture de la tolérance**

Quatre mécanismes participent à la rupture de la tolérance :

- Déséquilibre TH1/TH2 ;
- Activation polyclonale des Lymphocytes B ;
- Libération des antigènes séquestrés ;
- Anomalies du système du complément.

## **6. Physiopathologie des MAI**

Les MAI 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 et des facteurs d'environnement.

### **6.1. Facteurs prédisposant**

Quatre facteurs participent à l'apparition des maladies auto-immunes :

- Facteurs génétiques ;
- Facteurs infectieux ;
- Médicaments ;
- Hormones.

### **6.2. Mécanismes lésionnels des MAI**

#### **6.2.1. Lésions médiées par les auto- anticorps**

La preuve la plus éloquente du caractère pathogène des auto-Ac est la capacité de transférer la maladie par le sérum des malades atteints d'une MAI. Cette démonstration peut être faite, soit chez l'animal par le transfert passif du sérum à des animaux normaux, soit chez l'homme, par transfert transplacentaire des auto-Ac de classe G de la mère atteinte au fœtus. Ainsi, la myasthénie, l'hyperthyroïdie, le pemphigus peuvent-ils être induits chez la souris par le transfert d'IgG isolées à partir du sérum de malades. Le transfert d'auto-Ac de la mère à son fœtus est par exemple responsable de myasthénie néonatale, d'hyperthyroïdie ou de pemphigus vulgaire. Les mécanismes par lesquels les auto-Ac induisent des lésions cellulaires ou tissulaires sont divers. Quatre grands mécanismes peuvent être mis en jeu **[4] (Tableau 2)** :

**Tableau 2 : Mécanismes lésionnels des auto-anticorps**

Mécanismes		Maladies auto-immunes	
CYTOLYSE DIRECTE	Complément dépendante	LED	
	Cellulaire dépendante des Ac (ADCC)	Myocardite	
BLOPAGE FONCTIONNEL	D'une molécule circulante		
	D'une molécule membranaire	Blocage stérique	Myasthénie, thyroïdite, anémie de Biermer
		Modulation antigénique	Myasthénie
STIMULATION FONCTIONNELLE	D'un récepteur		Myasthénie, hyperthyroïdie, encéphalite de Rasmussen
	D'une activité enzymatique		Pemphigus, LED
INFLAMMATOIRE	Complexes immuns		LED, glomérulonéphrites

### 6.2.2. Lésions associées aux lymphocytes T

Les lymphocytes T sont plus responsables des lésions observées au cours des maladies auto-immunes que les auto-anticorps, leur implication est démontrée par plusieurs faits :

- Présence d'infiltrats de lymphocytes T au niveau des lésions de l'organe cible ;
- Association fréquente des MAI avec certaines molécules HLA-DR et HLA-B ; Sachant que la fonction des molécules HLA-DR est de présenter des Ag aux TCD4 et que la fonction des molécules HLA-B est

de présenter des Ag aux TCD8, ces associations suggèrent évidemment une importance cruciale des lymphocytes T ;

- Amélioration de la maladie par toutes les méthodes qui diminuent l'action des cellules T.

Les lymphocytes T exercent leur effet pathogène par plusieurs moyens :

- La cytotoxicité ;
- Libération des cytotoxines ;
- Activation des macrophages [04].

## VIII. Les Anticorps anti-nucléaires

### 1. Définition

Les anticorps anti-nucléaires constituent un groupe hétérogène d'auto-anticorps de spécificité diverses. Ils correspondent à un groupe d'auto-anticorps réagissant avec divers constituants du noyau. Leur recherche a un intérêt dans le diagnostic des connectivites [05], mais aussi dans des maladies auto-immunes spécifiques d'organes, et parfois au cours de certaines maladies infectieuses ou inflammatoires et chez les sujets âgés. La présence de certains anticorps anti-nucléaires permet parfois de préciser le diagnostic différentiel entre les connectivites, d'apprécier leur évolutivité et d'envisager un pronostic.

On observe des anticorps anti-nucléaires dans de nombreuses maladies [06] (Tableau 3), notamment dans la plupart des connectivites et dans les syndromes inflammatoires de toutes étiologies ; c'est dans le lupus érythémateux systémique (LES) que l'on observe les plus forts titres.

**Tableau 3 : Fréquence des anticorps anti-nucléaires dans différentes maladies auto-immunes systémiques**

Maladies Anticorps anti-nucléaires	(%)
Lupus érythémateux systémique	98
Polyarthrite rhumatoïde	30
Syndrome de Gougerot-Sjögren	80
Sclérodermie systémique	95
Poly- et dermatomyosite	10-30
Périartérite noueuse	0
Connectivite mixte de Sharp	100
Myasthénie	50
Hépatites virales	60
Sujets normaux > 60 ans	5

On distingue plusieurs sous-groupes selon la spécificité :

- Les Ac spécifiques d'acides nucléiques et de nucléoprotéines. Ils sont représentés par les anticorps anti-ADN, les anticorps anti-histones, et les anticorps anti-nucléosomes ;
- les anticorps spécifiques d'antigènes nucléaires solubles : anticorps spécifiques de certaines ribonucléoprotéines (anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SSA et anti-La/SSB) ;
- les anticorps dirigés contre des constituants du nucléole ;
- les anticorps dirigés contre des constituants du centromère.

## **2. Les anticorps spécifiques d'acides nucléiques et de nucléoprotéines**

### **2.1. Anticorps anti-ADN natif**

Les anticorps anti-ADNn constituent le plus souvent un mélange d'anticorps de faible et de forte affinité. Les anticorps de faible affinité reconnaissent aussi l'ADN dénaturé monocaténaire [07], mais ils ne sont pas caractéristiques du LES. Ils sont observés dans plus de 50 % des cas de lupus induit, dans les autres connectivites, les syndromes inflammatoires de toutes étiologies, ainsi que chez les personnes âgées en dehors de toute maladie. Les seuls anticorps anti-ADNn vraiment caractéristiques du LES ont une forte affinité pour l'auto-antigène et appartiennent généralement à l'isotype IgG.

### **2.2. Anticorps anti-histones**

Les histones sont des protéines basiques riches en arginine et en lysine. Ces protéines sont des éléments constitutifs de la chromatine nucléaire et sont couplées à la double hélice d'ADN. Il existe 5 classes différentes d'histones : H1, H2A, H2B, 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.

### **2.3. Anticorps anti-nucléosomes**

Certains auto-anticorps reconnaissent les structures formées par l'ADNn et les histones, c'est-à-dire les nucléosomes. Ils sont dirigés exclusivement contre les nucléosomes ou les sous-complexes nucléosomiques, et possèdent une faible réactivité envers les histones et l'ADNn. Des anticorps anti-nucléosomes, généralement d'isotype IgG, sont détectés chez environ 85 % des patients lupiques [08]. Ils précèdent souvent l'apparition des anticorps anti-ADNn, suggérant ainsi fortement et précocement le diagnostic. De plus, ils jouent un rôle pathogénique et sont associés à la survenue de glomérulonéphrites. Les nucléosomes sont des structures exposées à la membrane des cellules en apoptose à la phase précoce. Ils suscitent, dans les modèles expérimentaux du lupus, une réaction auto-immunitaire de type TH2 qui



aboutit à la production d'anticorps anti-histones H2 et d'anticorps anti-ADNn [09]. Ils s'observent au cours d'autres maladies auto-immunes (sclérodermie, syndrome de Sjögren) ainsi que dans l'infection à VIH.

### **3. Les anticorps spécifiques d'antigènes nucléaires solubles (anti-ECT)**

Anticorps spécifiques de certaines ribonucléoprotéines (anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SSA et anti-La/SSB) : reconnaissent des antigènes nucléaires solubles présents dans l'extrait de cellules thymiques de lapin (ECT) et de nature ribonucléoprotéique pour la plupart.

Les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles permettent de poser le diagnostic de connectivite, mais en dehors des anticorps anti-Sm qui sont hautement caractéristiques du LES, ils ne permettent généralement pas de préciser la nature de la connectivite et ne sont souvent que des éléments d'orientation [10, 11].

#### **3.1. Anticorps anti-Sm**

Les anticorps anti-Sm dénommés d'après Ms Smith chez qu'ils ont été décrits. Ils sont hautement caractéristiques du LES [12]. Les anticorps anti-Sm précipitent une famille de protéines associées à différentes chaînes d'ARN. Les auto-antigènes reconnus par les anticorps anti-Sm appartiennent à la famille des UsnRNP. Les UsnRNP sont des particules nucléaires composées de petits ARN et de protéines. Les ARN constituant ces particules sont riches en uridine d'où le préfixe Usn RNP.

#### **3.2. Anticorps anti-U1RNP**

Les anticorps anti-RNP ont été identifiés par Sharp en 1971 par immunodiffusion dans le sérum de patients atteints de connectivite mixte, dont ils constituent le marqueur sérologique. Ils reconnaissent le polypeptide de 70 kDa de la molécule de U1- RNP et les déterminants A et C de la protéine. Observés dans 25 à 30 % des LES, on peut les détecter au cours de la polyarthrite rhumatoïde, de la sclérodermie systémique diffuse, des myosites, et même dans le lupus induit par les médicaments. Les molécules Sm et U1RNP interviennent dans l'épissage des ARN pré-messagers au cours du processus de synthèse des protéines.

#### **3.3. Anticorps anti-Ro/SSA**

La première description des anti-Ro/SSA et de l'anti-La/SSB remonte à 1962. Ils sont constitués par des particules intracellulaires composées de protéines complexées à de petits ARN. Le motif antigénique reconnu par les anticorps est porté par la partie protéique de la ribonucléoprotéine. L'antigène Ro/SSA est composé d'au moins deux protéines de 60 et 52

kDa complexées avec de petits ARN cytoplasmiques appelés Y1, Y2, Y3, Y4 et Y5. Ces ARN sont synthétisés dans le noyau sous le contrôle d'une ARN polymérase III. La fonction de la protéine Ro est inconnue.

La présence des anticorps anti-Ro est associée à deux grandes connectivités : le lupus érythémateux disséminé (30 % des LES) et le syndrome de Gougerot-Sjögren (GS) (70 % des GS primaires, 30 % des GS secondaires). Au cours du LES, les anti-Ro sont associés environ une fois sur trois à des anticorps anti-La/SSB.

Les anticorps anti-Ro sont possiblement associés à deux types de complications : des troubles du rythme cardiaque et une éruption lupique transitoire qui caractérisent le lupus néonatal [13]. Le bloc auriculo-ventriculaire congénital et le bloc de branche surviennent chez 2 % des nouveau-nés de mère lupique ayant un anti-Ro [14], mais aussi chez le nouveau-né de mère atteinte de toute connectivité avec anticorps anti-Ro. Dans sa forme modérée, le bloc auriculo-ventriculaire peut être transitoire. Dans sa forme grave, il peut aboutir à la mort fœtale.

### **3.4. Anticorps anti-La/SSB**

Le complexe La/SSB est constitué d'une protéine phosphorylée de 48 kDa couplée à des ARN transcrits par l'ARN polymérase III. Les ARN identifiés correspondent aux précurseurs de l'ARNt et de l'ARN ribosomal 5S et 7S. Certains ARN d'origine virale (Epstein Barr Virus, virus de la stomatite vésiculeuse) peuvent être associés à la protéine La. Leur présence incite à chercher l'association d'un syndrome de Gougerot-Sjögren.

### **3.5. Anticorps anti-PCNA**

L'antigène PCNA (proliferating cell nuclear antigen) est une protéine de 36 kDa identifiée comme une protéine auxiliaire de l'ADN polymérase delta. Il est présent chez des patients atteints de LES et caractérise une atteinte rénale grave ou neurologique.

### **3.6. Anticorps anti-Ma**

Ils sont fréquents dans les lupus graves avec atteinte rénale, hypertension artérielle et atteinte neurologique.

### **3.7. Anticorps anti-Jo1**

L'antigène Jo1 est présent dans le noyau des hépatocytes de veau et les fibres musculaires humaines. Les anticorps spécifiques confèrent à l'immunofluorescence indirecte un aspect moucheté sur cellules HEp-2. Le poids moléculaire est de 150 kDa. Ces anticorps, dirigés contre l'histidyl-ARNt synthétase, font partie du groupe des anticorps anti-synthétases.

Les anticorps anti-Jo1 sont présents chez des patients atteints des myosites et chez des patients atteints des myosites avec atteinte pulmonaire. Ils ont un intérêt diagnostique car ils sont spécifiques de ces affections.

### **3.8. Autres anticorps anti-synthétases**

Il s'agit des anticorps :

- anti-thréonyl-ARNt synthétase (anti-PL-7) ;
- anti-alanyl-ARNt synthétase (anti-PL-12) ;
- anti-isoleucyl-ARNt synthétase (anti-OJ) ;
- anti-glycyl-ARNt synthétase (anti-EJ).

Ces anticorps ne sont recherchés que dans des laboratoires spécialisés. Ils définissent le syndrome des anti-synthétases, se caractérisant par une myosite, une pneumopathie interstitielle, des arthrites, un syndrome de Raynaud et une hyperkératose desquamant et fissurée des mains, généralement associés à de la fièvre et à un syndrome inflammatoire général. En dépit de leur faible fréquence, ces anticorps sont très utiles en clinique car ils sont très spécifiques de ce syndrome.

### **3.9. Anticorps anti-PM/Scl**

Cet anticorps produit une fluorescence nucléolaire homogène. Il reconnaît des antigènes solubles du noyau constitués de 11 protéines de poids moléculaire de 20 à 110 kDa. Leur dénomination traduit un chevauchement entre des signes de myosite et des signes de sclérodémie, avec un risque élevé d'atteinte rénale.

### **3.10. Anticorps anti-Ku**

Ils reconnaissent une protéine non histonique de la chromatine de 80 kDa. Ils peuvent se traduire par une fluorescence nucléolaire mais sont plus souvent responsables d'un marquage nucléaire réticulé. Comme les anti-PM/Scl, ils sont fréquemment rencontrés dans les syndromes de chevauchement entre polymyosite et sclérodémie.

### **3.11. Anticorps anti-PM1**

Ces anticorps sont présents chez les patients atteints : des polymyosites, des dermatomyosites, et des polymyosites associées à une sclérodémie. En dehors des chevauchements avec la sclérodémie, cet auto-anticorps ne permet pas de définir une forme clinique particulière de polymyosite.

### **3.12. Anticorps anti-SRP**

Ils reconnaissent des protéines assurant un signal de reconnaissance pour le transport de particules au sein du cytoplasme et permettent de définir une forme clinique particulièrement grave et résistante au traitement.

### **3.13. Anticorps anti-Mi-2**

Ils sont spécifiques d'une enzyme qui remodèle le nucléosome et sont détectés essentiellement au cours des dermatomyosites.

### **3.14. Anticorps anti-Scl 70**

L'appellation de ces anticorps vient de leur fréquence dans les formes systémiques de sclérodémie et du poids moléculaire (70 kDa) initialement attribué à l'auto-antigène. Cet antigène a été identifié comme la topo-isomérase I qui joue un rôle dans la transcription de l'ADN. En IFI sur cellules HEp-2, les anticorps anti-Scl70 se traduisent en général par un aspect assez caractéristique : moucheté, fin et dense, pouvant être associé à un marquage périphérique du nucléole. Les cellules en division présentent un marquage dense de la chromatine. Les anticorps anti-Scl70 sont présents chez les patients atteints des sclérodémies systémiques avec forme cutanée diffuse. Ils sont spécifiques de cette maladie.

### **3.15. Les anticorps dirigés contre des constituants du centromère**

Avant de se diviser, la cellule voit doubler ses chromosomes par réplication de l'ADN. 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.

## **IX. Les techniques de mise en évidence des anticorps anti-nucléaires**

### **1. Dépistage par l'immunofluorescence indirecte (IFI)**

#### **1.1. Principe**

Cette technique étudie la fixation des AAN du sérum sur des lames qui contiennent les noyaux des cellules HEp-2 (human epithelial cell line : type 2), ces cellules possèdent un noyau de grande taille à plusieurs nucléoles, ce qui améliore la définition des aspects de fluorescence. Leur culture sur lame permet d'obtenir des cellules à différents stades du cycle cellulaire favorisant ainsi la détection des AAN dirigés contre des cibles uniquement présentes à certaines phases du cycle. L'incubation du sérum sur les lames de Hep-2 se poursuit par un lavage et puis l'ajout des anticorps anti immunoglobuline marqué par la fluorescéine (ou le conjugué). Si le sérum révèle des anticorps anti-nucléaire qui sont dépistés à un seuil de 1/80 [15]. Il est testé à différentes dilutions poursuivies jusqu'à l'extinction de la fluorescence [16]. L'aspect de la fluorescence donnant une indication sur la spécificité de l'auto-anticorps détecté, et le titre de la fluorescence présente une idée sur la gravité ou non de la maladie.

### **2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

#### **2.1. Principe**

Ce test est réalisé par incubation des sérums à tester avec des antigènes solubles fixés par absorption sur un support en polystyrène. On fait ensuite révéler la réaction par un conjugué (Ac couplé avec un enzyme) détectable par l'ajout du substrat de l'enzyme qui s'accompagne de l'apparition d'une substance chromogène, et la réaction peut être quantifiée alors par la lecture au spectrophotomètre [17].

### **3. Immuno-dot**

#### **3.1. Principe**

L'immuno-dot consiste à déposer les antigènes sur une membrane de nitrocellulose et la présence d'anticorps est révélée par une réaction colorée. Cette technique permet une identification ponctuelle en urgence sur un sérum individuel, mais la sensibilité et la spécificité des tests sont conditionnées par le choix et la qualité des préparations antigéniques utilisées. Ces tests permettent l'identification simultanée de plusieurs anticorps sur une même bande.

Les bandes fournissent une analyse qualitative (in vitro) des auto-anticorps humains appartenant à la classe IgG, contre les différents antigènes : nRNP, SSA, SSB, Scl 70, Jo-1,

DNA, CENP B, dsDNA, Nucléosome, Histone et la protéine P ribosomale présents dans le sérum ou le plasma [18, 19].

Il existe autres techniques pour la mise en évidence des anticorps anti-nucléaires comme la Radio-Immuno-Aissy et Multiplex (Luminex).

## X. Démarche diagnostique

### 1. Recherche des Anticorps anti-nucléaire sur HEP-2

#### 1.1. Choix de conjugué et de la dilution

Dans les connectivites et notamment le LED, la majorité des AAN sont des IgG [20] mais toutes les classes d'immunoglobulines peuvent être observées. S'il n'existe pas de consensus pour la révélation des anticorps fixes, certains utilisant comme antisérum conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine des anticorps anti-immunoglobulines polyvalentes, d'autres des anti-IgG humaines, soulignons cependant que l'utilisation d'une anti-IgG humaine peut parfois améliorer l'image de la fluorescence nucléaire [21].

Le dépistage des AAN chez l'adulte s'effectue en diluant le sérum au 1/80 ou au 1/100. A la dilution du 1/80, 13 % des sérums normaux sont positifs contre 5 % au 1/160, selon Adams [22]. Chez l'enfant, il est possible de faire le dépistage avec une dilution moins forte bien que 9% des sérums de sujets sains soient positifs au 1/40 et seulement 3 % au 1/80, selon Wananukul [23].

#### 1.2. Aspects de fluorescence et corrélations cliniques

La lecture avec un microscope à UV au grossissement minimum de X40 permet de déterminer l'aspect et le titre en anticorps, correspondant à l'inverse de la plus forte dilution du sérum donnant encore une fluorescence nucléaire [24]. Une meilleure définition de l'aspect peut être obtenue par une observation à l'immersion.

##### → *Fluorescence nucléaire*

Il existe quatre grands types de fluorescence nucléaire (détectant donc des anticorps anti-nucléaires) : homogène, moucheté, nucléolaire et périphérique.

✚ **Aspect homogène** : le noyau se colore uniquement de façon homogène (Figure 2).

✚ **Aspect moucheté** : il existe plusieurs types mais les principaux sont :

- Mouchetée à gros grains : points de fluorescence de taille moyenne uniforme répartis dans tout le noyau avec des bords nucléaires distincts (Figure 3).

- Moucheté à grains fins : nombreux petits points de fluorescence uniformes, répartis dans tout le noyau avec des bords nucléaires distincts (Figure 4).

✚ **Aspect nucléolaire** : La fluorescence des nucléoles peut donner un aspect homogène (Figure 5).

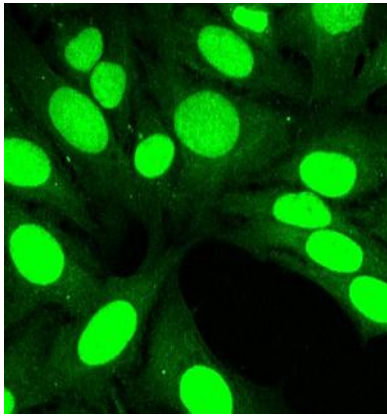
✚ **Fluorescence périphérique** : le noyau se colore principalement à sa périphérie.

L'aspect de la fluorescence permet d'orienter le diagnostic, car il évoque un ou plusieurs antigènes cibles et une ou plusieurs pathologies associées (Tableau 4).

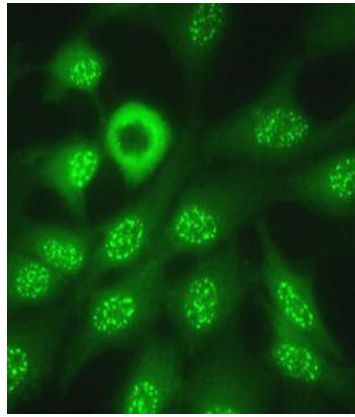
**Tableau 4 : L'aspect de la fluorescence en fonction des antigènes cibles et les pathologies associées**

Aspect en fluorescence	Antigène cible	Pathologies associées
Homogène	dsDNA, Histone	LES, Polyarthrite rhumatoïde Lupus induit
Nucléolaire	Pm/Scl	Polymyosite, Sclérodémie, Syndrome de chevauchement
Mouchetée à gros grains	anti-Sm / snRNP	LES, Syndrome de chevauchement
Moucheté à grains fins	SSA/SSB	LES, Syndrome de Sjögren, Sclérodémie

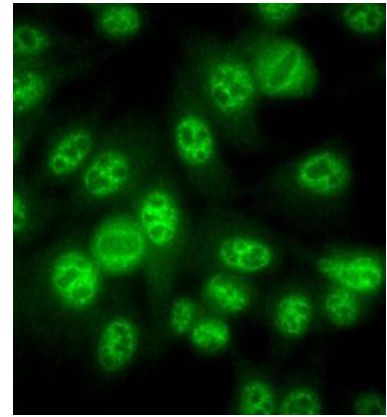
Notons qu'il n'est pas rare d'observer des aspects mixtes mêlant plusieurs types de fluorescence : Fluorescence mixte nucléaire-homogène et nucléolaire ou Fluorescence nucléaire mixte mouchetée et nucléolaire (Figure 6 et 7).



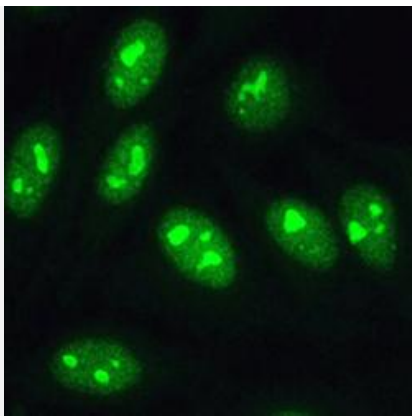
**Figure 2 : Fluorescence d'aspect homogène des AAN sur cellules Hep-2**



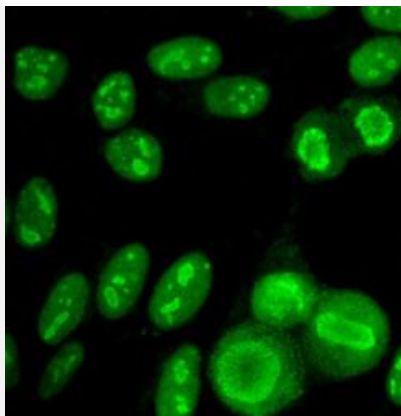
**Figure 3 : Fluorescence d'aspect mouchetée à gros grains sur cellules Hep-2**



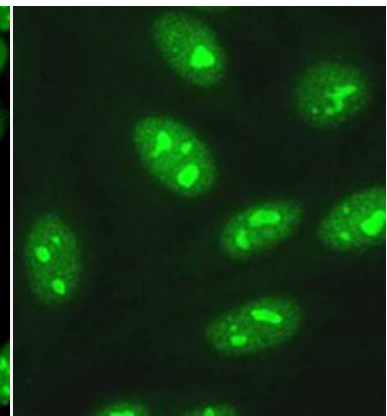
**Figure 4 : Fluorescence d'aspect mouchetée à grains fins sur cellules Hep-2**



**Figure 5 : Fluorescence d'aspect nucléolaires des AAN sur cellules Hep-2**



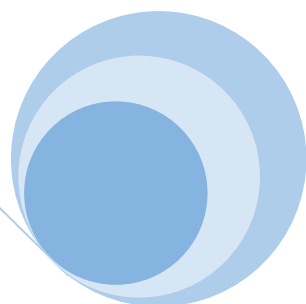
**Figure 6 : Fluorescence mixte nucléaire homogène et nucléolaire**



**Figure 7 : Fluorescence nucléaire mixte mouchetée et nucléolaire**



# Matériel et Méthodes



Nous avons d'abord recherché et titré les anticorps anti-nucléaires totaux par la méthode d'immunofluorescence indirect, ELISA. Nous avons ensuite cherché à les identifier par la technique de l'immuno-dot.

## **XI. Population étudiée**

Cette étude a porté sur 105 sérums correspondant à une population de 105 patients ayant demandé l'analyse au service d'immunopathologie de l'institut Pasteur du Maroc à Casablanca, entre le 01 mai 2013 et le 31 juin 2014.

## **XII. Matériel et méthodes**

### **1. Dosage de anti-ADN natif par ELISA**

#### **KIT (BIO RAD, REF 31008, Anti-dsDNA)**

Les micropuits sont sensibilisés avec une préparation d'ADN de thymus de veau. Lors de la première incubation, les anticorps anti-nucléaires spécifiques dans du sérum ou du plasma dilué se lient à l'antigène fixé. Les micropuits sont ensuite lavés afin d'éliminer les éléments du sérum ou du plasma qui ne se sont pas fixés. Un conjugué formé d'anticorps polyclonaux marqués par une enzyme et dirigés contre les IgG et les IgM humaines se lie aux anticorps de surface fixés durant la deuxième incubation. Après un nouveau lavage, les anticorps spécifiques sont recherchés par incubation avec une solution de substrat. L'addition de la solution d'arrêt met un terme à la réaction et détermine le pH approprié pour le développement de la coloration. La quantité de conjugué lié est mesurée en unités d'absorption.

#### **Réactifs**

- Diluant concentré A pour échantillons : [5X], 1 x 25 ml ;
- Solution de lavage concentrée : [16X], 2 x 25 ml ;
- Contrôle Négatif : 1 x 130 µl ;
- Contrôle de Référence : 1 x 1,5 ml ;
- Contrôle Positif : 1 x 230 µl ;
- Calibrateurs 0-4 : 5 x 1,0 ml chacun ;
- Conjugué IgG/IgM : 1 x 15 ml ;
- Substrat : 1 x 15 ml ;
- Solution d'arrêt : 1 x 15 ml.

#### **Matériel**

- Microplaque : 12 x 8 barrettes de micropuits (Sensibilisés avec l'antigène ADN natif) ;
- Lecteur de barrettes ou de plaque de 96 puits avec un filtre à 550 nm. Les filtres se situant dans l'intervalle 540-565 nm donneront des résultats acceptables ;
- Pipettes de précision pouvant délivrer 10 µl, 100 µl et 1,0 ml ;
- Un pipeteur automatique de 100 µl ;

- Laveur de plaques automatique ou pipeteur automatique de 200 µl ;
- Un chronomètre pour déterminer des intervalles de temps de 30 et 60 minutes ;
- Des éprouvettes graduées en verre ou en plastique de 100 et 400 ml ;
- Des serviettes en papier absorbant ;
- De l'eau distillée ;
- Des tubes ou des récipients adaptés (1 ml) pour la dilution des échantillons.

### Méthodologie

- Une dilution de 1/100 du sérum et du contrôle (positif et négatif) ;
- Ajouter 100 µl du sérum et du contrôle dans les puits ;
- Incuber une heure dans une température ambiante ;
- 3 Lavages avec la solution de lavage (diluée 1/16) (300 µl dans chaque puits) ;
- Ajouter 100 µl du conjugué enzymatique ;
- Incuber 30 min dans une température ambiante ;
- 3 Lavages avec la solution de lavage (diluée 1/16) (300 µl dans chaque puits) ;
- Ajouter 100 µl de substrat ;
- Tracer la courbe d'étalonnage (Do en fonction de la concentration) et calculer les concentrations d'anticorps à l'aide d'un lecteur d'ELISA (Figure 8).

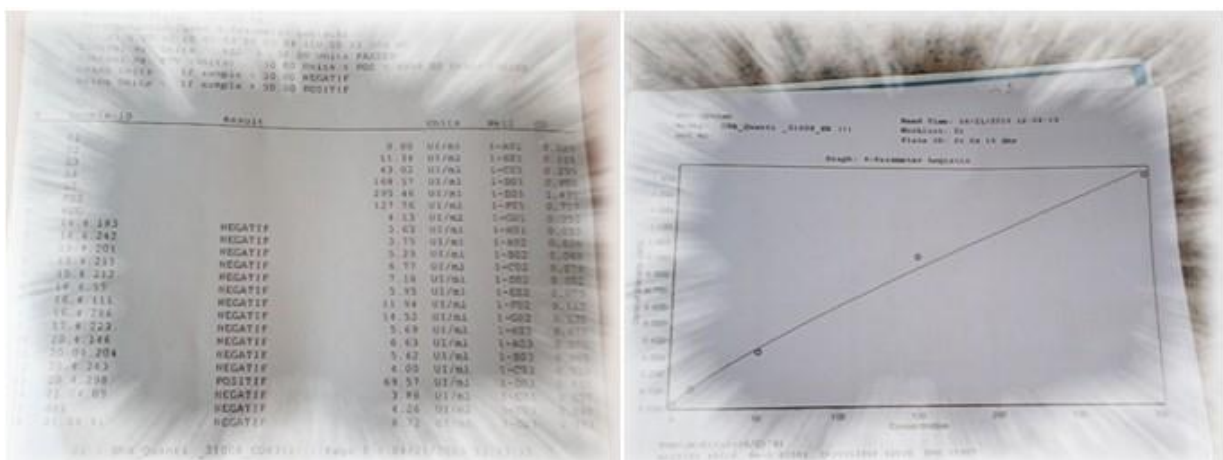


Figure 8 : Exemple de résultats obtenus et de la courbe d'étalonnage

**La valeur Seuil : 100 UI/ml**

## 2. Dosage et titrage des anticorps anti-nucléaires par IFI

**KIT (BIO RAD, REF 30472, HEp-2 Cell Line Substrate)**

Les anticorps anti-nucléaires présents dans un échantillon à analyser se lient aux antigènes dans le substrat. Le lavage élimine l'excédent de sérum du substrat. L'antisérum conjugué à la fluorescéine FITC ajouté au substrat se fixe aux anticorps liés. Après un second lavage pour éliminer l'excédent de conjugué, recouvrir le substrat d'une lamelle couvre-objet et l'examiner pour la présence d'aspects fluorescents sous un microscope à fluorescence. L'observation d'aspects fluorescents spécifiques sur le substrat indique la présence d'anticorps anti-nucléaires dans l'échantillon à analyser, et nous permet de déterminer le titre (1/80, 1/160, 1/320 ...).

### **Réactifs**

- Contrôle positif 0.5 ml ;
- Contrôle négatif 0.5 ml ;
- Conjugué à la fluorescence FITC 2.5 ml ;
- Milieu de montage 2.5 ml ;
- PBS tampon phosphate salin ;
- Contre-colorant au bleu d'Evans 2.5 ml.

### **Matériel**

- Lames de substrat ;
- Lamelle couvre-objet 24 X 60 mm ;
- Micropipette calibrée ou réglable à 25 µl ;
- Portoir pour tube essai ;
- Chambre humide ;
- Cuve à coloration ;
- Flacon de lavage ;
- Eau distillée ;
- Microscope à fluorescence.

### **Méthodologie**

- Préparer la dilution (1/80) de sérums ;
- Ajouter le sérum et les contrôles positif et négatif dans les puits de la lame ;
- Incuber 30 min à 37°C avec chambre humide ;
- Rincer puis laver pendant 10 min avec agitation ;
- Sécher la lame ;
- Ajouter le conjugué ;
- Incuber 30 min à 37°C avec chambre humide ;
- Rincer puis laver pendant 10 min avec agitation ;
- Sécher la lame ;
- Monter la lame à l'aide de lamelle couvre-objet.



**Figure 9 : Lames de substrats sensibilisées par Hep-2**

## **9. Identification des anticorps anti-nucléaires solubles (Anti-ECT) par l'immuno-dot**

### ➤ **KIT (EUROIMMUN, Anti-ECT)**

C'est un test qualitatif qui permet l'identification des anticorps anti-nucléaires solubles (Anti-ECT) de classe IgG dans le sérum. On utilise dans ce test des bandelettes sensibilisées par des auto-antigènes. Le changement de la coloration des bandelettes qui indiquent que la réaction est positive.

### **Réactifs**

- Contrôle positif 100X, 0.02 ml ;
- Enzyme conjugué 3ml ;
- Substrat 30 ml ;
- Solution de lavage 50 ml ;
- Diluant 100 ml.

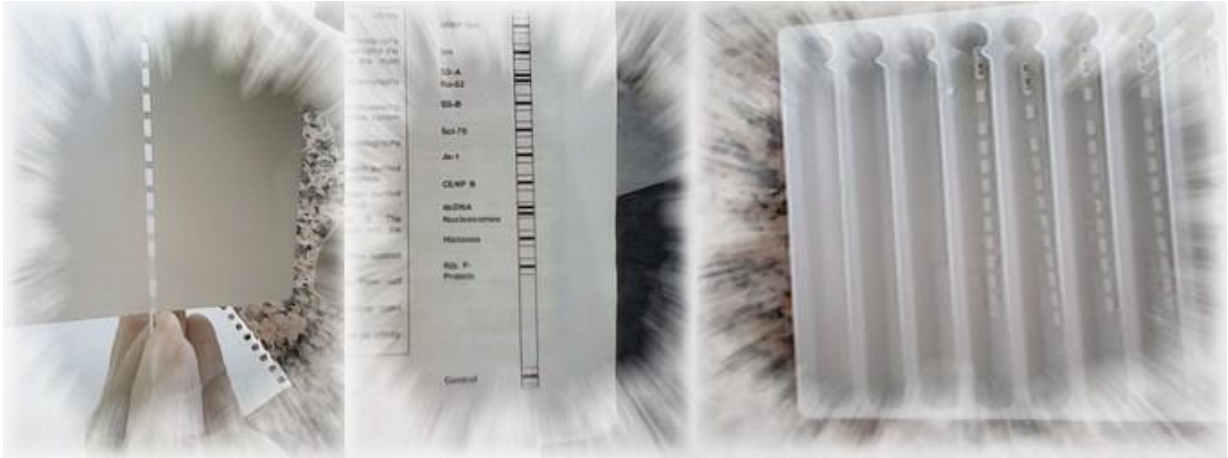
### **Matériel**

- Bandelettes sensibilisées contre les ECT (**Figure 10**) ;
- Pipettes de précision pouvant délivrer 10 µl, 100 µl et 1.0 ml ;
- Un chronomètre pour déterminer des intervalles de temps de 30,60 et 10 minutes ;
- Des serviettes en papier absorbant ;
- De l'eau distillée ;
- Un agitateur automatique.

### **Méthodologie**

- Mettre les bandelettes dans les canaux de la plaque immuno-dot (**Figure 10**) ;
- Ajouter 1.5 ml de diluant + 15 µl de sérums dans les canaux avec les bandelettes ;
- Incuber une heure avec agitation ;
- Ajouter 1.5 ml du diluant + 150 µl du conjugué ;
- Incuber 30 min sous l'agitation ;
- Laver les bandelettes (aspirer les solutions précédentes par une micropipette et ajouter 1.5 ml de la solution de lavage) ;
- Aspirer la solution de lavage avec une micropipette ;

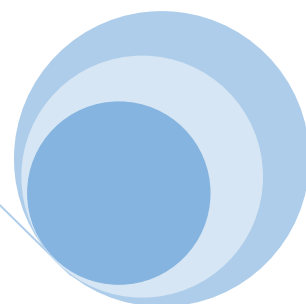
- Ajouter 1.5 ml de substrat ;
- Incuber 10 min avec agitation ;
- Laver les bandelettes ;
- Lecture à l'aide du prospectus du kit (**Figure 10**).



**Figure 10 : Bandelettes sensibilisées contre les anti-ECT**



# Résultats et discussion



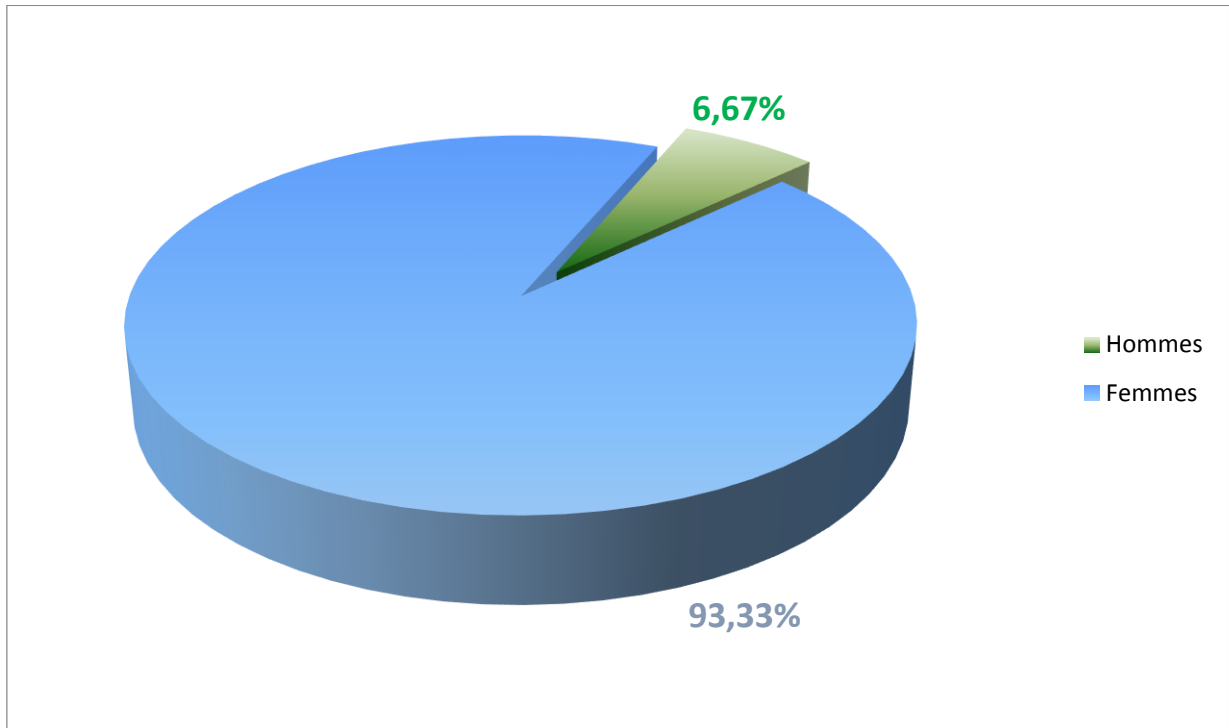


# I. Résultats

## 1. Répartition selon le sexe

Sur les 105 cas étudiés :

98 sont des femmes (93,33%) et 7 sont des hommes (6,67%) (**Figure 11**).

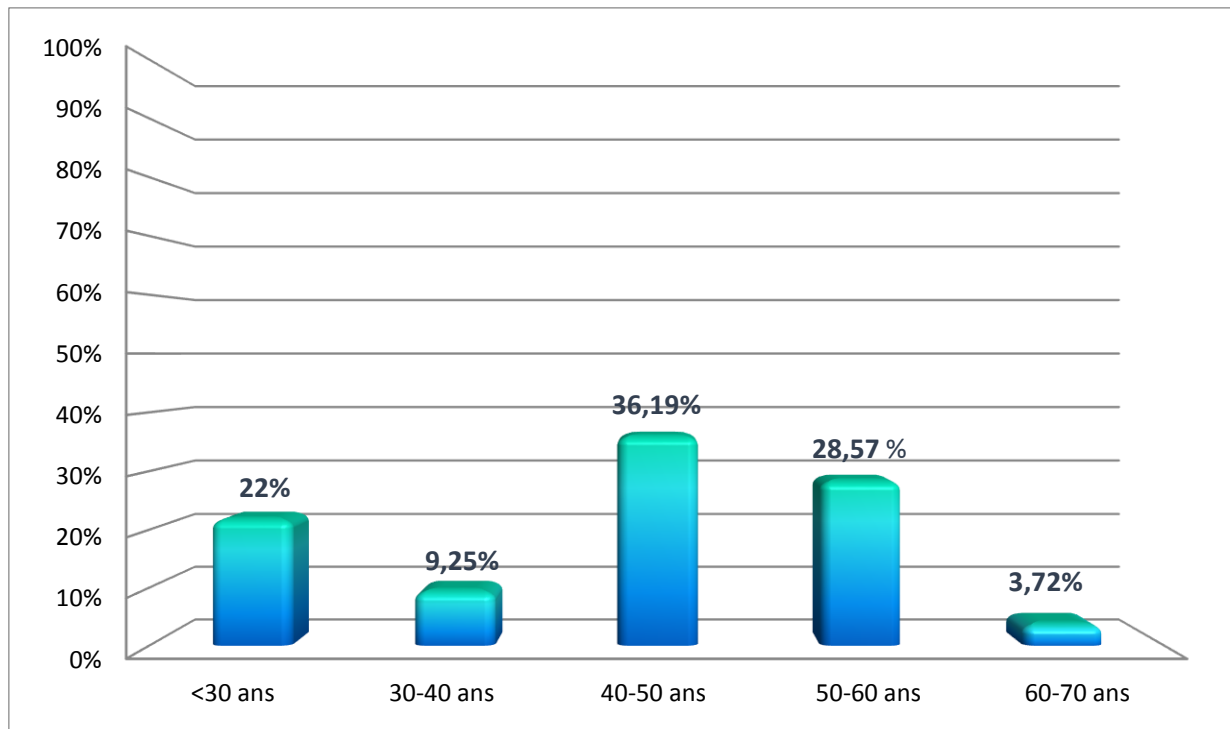


**Figure 11 : Répartition des patients selon le sexe**

D'après cette figure on remarque que le pourcentage de femmes malades est plus grand que celui des hommes.

## 2. Répartition selon l'âge

La figure 12 représente la répartition des patients selon l'âge :

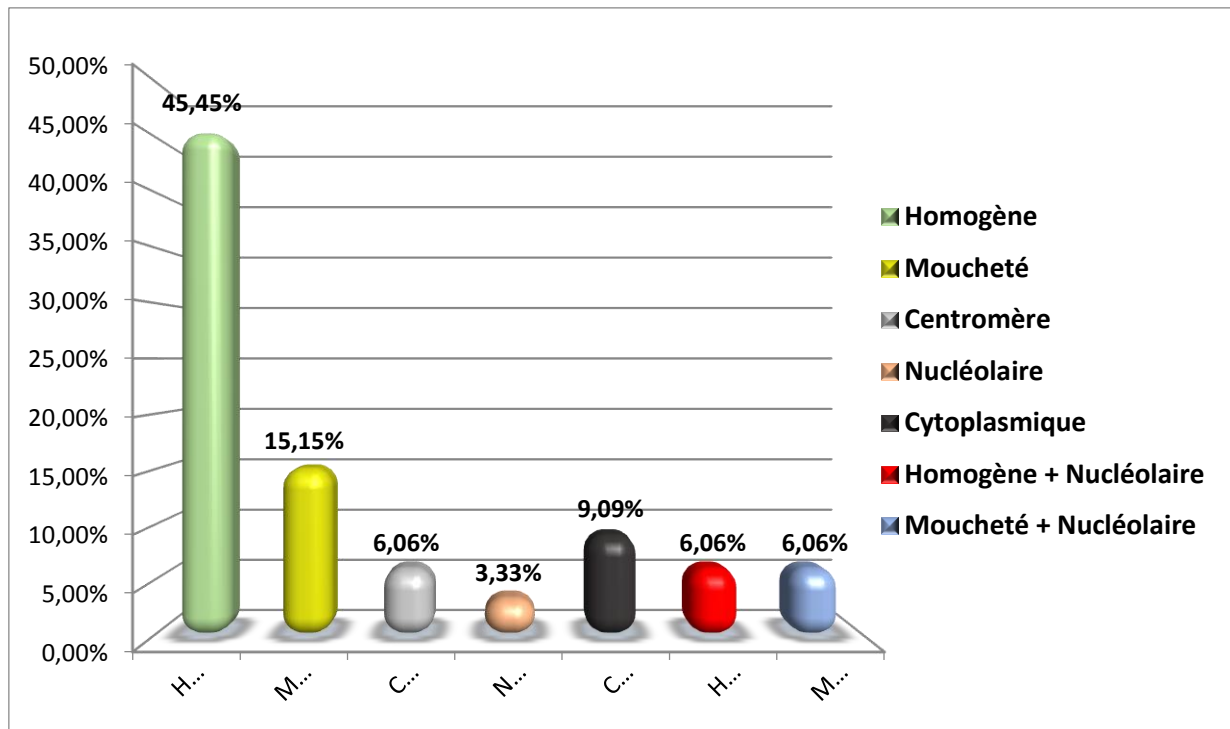


**Figure 12 : Répartition des patients selon l'âge**

L'analyse de la répartition selon l'âge montre que la tranche la plus élevée est celle de 40-50 ans (36,19%), cette tranche est suivie par les tranches 50-60ans (28,57%), <30 ans (22%), 30-40 ans (9,25%) et 60-70 ans (3,72).

### **3. Répartition des patients selon l'aspect de la fluorescence**

D'après la technique d'IFI on a observé qu'il y a différents aspects de la fluorescence (moucheté, homogène, cytoplasmique, nucléolaire, centromère, homogène+ nucléolaire, moucheté + nucléolaire), ces aspects ont été observé par le microscope à fluorescence. Les résultats de ces observations sont reportés sur la **Figure 13**.

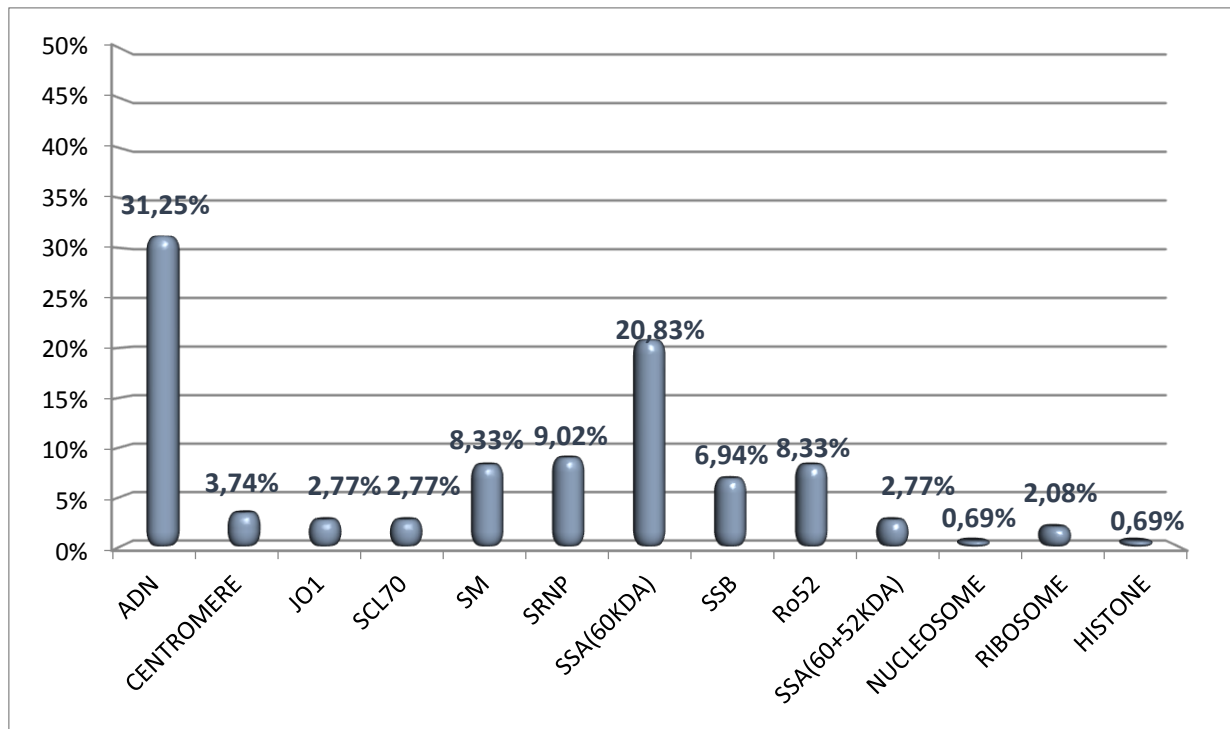


**Figure 13 : Répartition des patients selon l'aspect de la fluorescence**

La figure 13 montre la répartition des pourcentages de différents aspects de la fluorescence chez les 100 patients (dépistage par IFI positif). L'aspect homogène représente le pourcentage le plus élevé (45,45%), suivi par celui de l'aspect moucheté (15,15%), en suite le pourcentage de l'aspect cytoplasmique (9,09%) puis les 3 pourcentages des aspects moucheté-nucléolaire, homogène-nucléolaire et centromère (6,06%), et dans la dernière position vient l'aspect nucléolaire qui représente 3,33%.

#### **4. Répartition selon le type de l'anticorps**

La figure 14 représente la répartition des patients selon la nature des anticorps anti-nucléaires identifiés par les trois techniques ; immunofluorescence indirect, ELISA et l'immuno-dot.



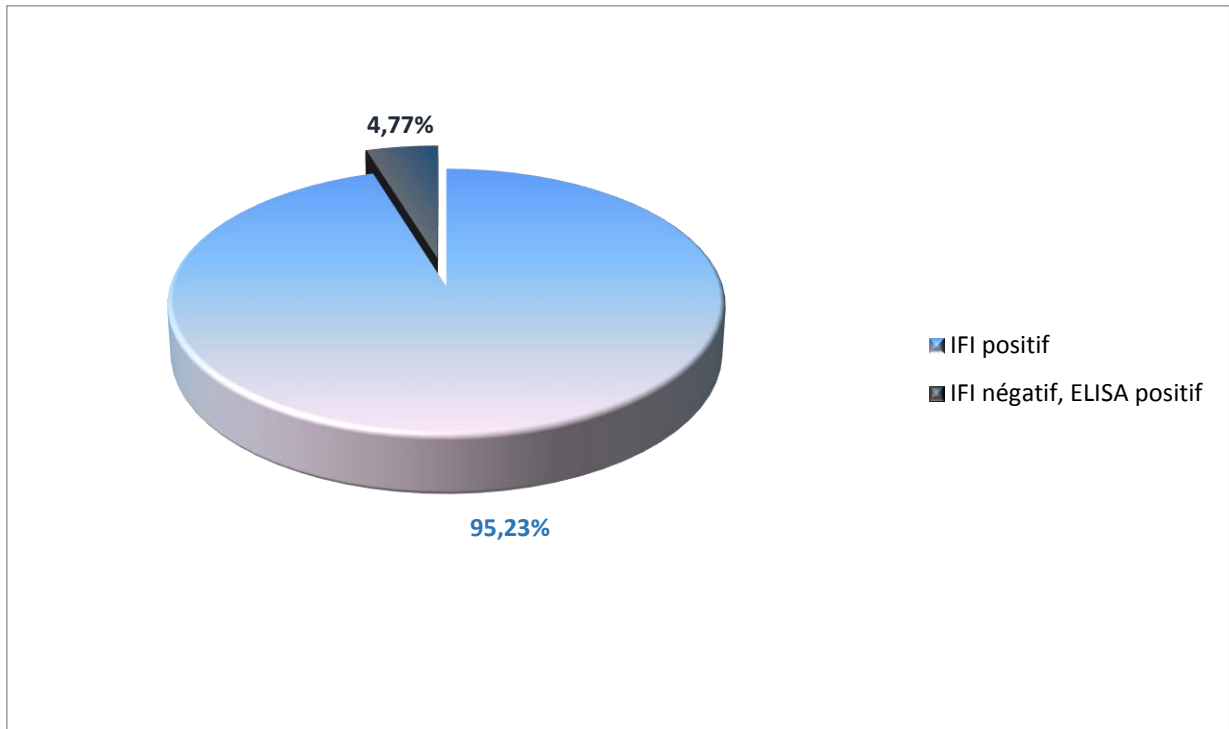
**Figure 14 : Répartition en fonction de la nature de l'anticorps**

Nos résultats sur la répartition des malades en fonction de la nature de l'anticorps montrent que ; 31,25% des patients sont positifs pour les anticorps anti-ADN, 20,83% sont positifs pour les anticorps anti- SSA (60 kDa), 9,02% sont positifs pour les anticorps anti-SRNP, dans la 4ème position vient les anticorps anti-SM et les anticorps anti-Ro52 avec un pourcentage de 8,33%, puis 6,94% sont positifs pour les anticorps anti-SSB, puis 3,74% des patients sont positifs pour les anticorps anti-CENTROMERE, dans la 7ème position vient les anticorps anti-JO1, les anti-SCL70 et les anti-SSA (60+52 kDa) avec un pourcentage de 2,77%, puis 2,08% des malades sont positifs pour les anticorps anti-RIBOSOME, et pour la dernière position vient les anti- NUCLEOSOME et les anti-HISTONE avec un pourcentage de 0,69%.

##### **5. Analyse par immunofluorescence indirect et ELISA (cas particuliers)**

Parmi les 105 cas étudiés :

100 cas se sont révélés positifs par immunofluorescence indirect (soit 95,23%), et 5 cas se sont révélés négatifs par immunofluorescence indirect mais positifs par ELISA (soit 4,77%) (**Figure 15**).



**Figure 15 : Répartition selon la positivité de l'IFI**

Chez les cinq patients (4.77%) on a trouvé par ELISA quelque anticorps anti-ADN en très faible quantité, alors que le dépistage par IFI est négatif (**Tableau5**).

**Tableau 5 : Présence des anticorps anti-ADN chez quelques patients même si le dépistage par immunofluorescence indirect est négatif**

Age	Sexe	AAN	Titre AAN Seuil < 80	ADN	Titre ADN Seuil < 100	Identification
27	F	Négatif	-----	Pos	156	ADN
50	F	Négatif	-----	Pos	136,38	ADN
54	F	Négatif	-----	Pos	110	ADN
39	F	Négatif	-----	Pos	110	ADN
39	F	Négatif	-----	Pos	110	ADN

Ces résultats montrent chez ces 5 patients que les anticorps anti-ADN sont détectés par ELISA même si le dépistage par immunofluorescence indirect est négatif.

## **6. Comparaison des titres de l'anti-ADN**

La valeur moyenne du titre des anticorps anti-ADN (réalisée par ELISA) chez les patients ayant le dépistage par IFI positif est : **335 UI**, et celle chez les patients ayant le dépistage par IFI négatif est **124 UI**.

## II. Discussion

Notre étude portant sur 105 patients a montré que 93,33% étaient des femmes et 6,67% étaient des hommes. Ces résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature, et peut être expliqué par l'influence de certaines hormones à savoir les œstrogènes car leur administration favorise l'apparition de lupus érythémateux disséminé [25].

La répartition des patients selon l'âge a montré que les tranches d'âge les plus élevées sont les tranches 40-50 ans et 50-60 ans avec les pourcentages de 36,19% et 28,57% respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par une étude rétrospective à propos d'une série de 90 patients réalisée au sein de CHU Habib Bourguiba de Sfax à Tunis [26].

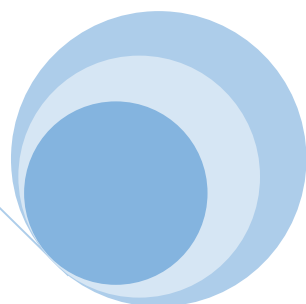
En ce qui concerne les aspects de la fluorescence, une prédominance de l'aspect homogène a été remarquée (45,45%) ceci peut être expliqué par le fait que les patients sont atteints par le Lupus érythémateux systémique, Polyarthrite rhumatoïde et/ou Lupus induit.

Quant aux types d'anticorps, on note une prédominance remarquable des anti-ADN qui se traduit par la prédominance de l'aspect homogène.

Nos résultats ont montré aussi que chez 5 patients les anticorps anti-ADN sont détectés en faible quantité par ELISA même si leur dépistage par immunofluorescence est négatif.

La technique de l'ELISA est plus sensible que l'immunofluorescence indirect pour la détection des anticorps anti-nucléaires, et permet la révélation de titres plus faibles.

# Conclusion





## **Conclusion**

Nous avons réalisé une étude rétrospective du profil des anticorps anti-nucléaires dans la région de Casablanca, cette étude a porté sur 105 patients.

Les résultats de notre étude ont montré que la majorité de ces patients sont des femmes et que les tranches d'âge qui prédominent sont 40-50 ans et 50-60 ans avec des fréquences de 36,19% et 28,57% respectivement.

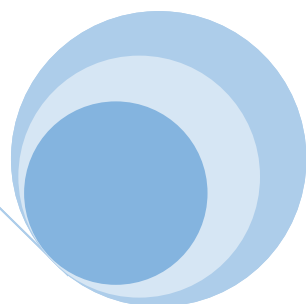
L'aspect de la fluorescence le plus dominant chez ces patients est l'aspect homogène, alors que le pourcentage de types d'anticorps le plus élevé est celui de l'anti-ADN.

La détection des anticorps anti-nucléaires et la détermination de leur titre peut se faire par les techniques ; immuno-dot, ELISA et immunofluorescence indirect.

Nos résultats ont confirmé que la technique d'ELISA est plus sensible que l'immunofluorescence indirect et a permis la détection des anticorps anti-ADN chez 5 patients pour lesquelles la technique de l'immunofluorescence indirect n'a pas permis la détection de ces anticorps.



# Références bibliographiques



## Références Bibliographiques

**[01]: Jean Hamburger. (2004).**

Flammarion médecine sciences – Actualités néphrologiques.

**[02]: Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C. G. (2005).**

Cellular and genetic mechanisms of self-tolerance and autoimmunity. *Nature* 435: 590-597.

**[03]: Beutler, B. (2004).**

Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257-263.

**[04]: Hugo Mouquet. (2006).**

Le rôle de l'autoantigène dans les maladies auto-immunes : Etude de la desmogleine 1 au cours des pemphigus.

**[05]: Von Muhlen CA, Tan EM. A. (1995).**

Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*; 24: 323-58.

**[06]: Batteux F, Goulvestre C, Weill B. (2003).**

Maladies auto-immunes. In : Weill B, Batteux F, eds. *Immunopathologie et réaction inflammatoire*. Louvain : De Boeck Université; p. 61-112.

**[07]: Aarden LA, Smeenk R. (1982).**

Immunochemical properties of antibodies to DNA and their influence on detection methods. In: Kalden JR, Feltkamp TE, eds. *Antibodies to nuclear antigens*. Amsterdam: Excerpta Medica; p. 23-8.

**[08]: Chabre H, Amoura Z, Piette JC, Godeau P, Bach JF, Koutouzov S. (1995).**

Presence of nucleosome restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*; 38: 1845-91.

**[09]: Trébéden-Nègre H, Weill B, Fournier F, Batteux F. (2003).**

B cell apoptosis accelerates the onset of murine lupus. *Eur J Immunol*; 33: 1603-12.

**[10]: Youinou P, Le Goff P, Sarraux A. (1998).**

Pratique et interprétation des examens biologiques dans les maladies systémiques. In: Kahn MF, Peltier AP, Meyer O, Piette JC, eds. *Les maladies systémiques*. Paris: Flammarion Médecine-Science; p. 77-128.

**[11]: Juby A, Johnston C, Davis P. (1991).**

Specificity, sensitivity and diagnostic predictive value of selected laboratory generated autoantibody profiles in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol*; 18: 354-8.

**[12]: Riemekasten G, Marell J, Trebeljahr G, Klein R, Hausdorf G, Haupl T. (1998).**

A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*; 102: 754-63.

- [13]: **Herremang G, Sauvaget T, Genereau T, Galezowski N. (1990).**  
Blocs auriculo-ventriculaires congénitaux et maladies autoimmunes maternelles. *Ann Med Intern*; 141: 234-8.
- [14]: **Reichlin M, Brucato A, Franck MB, Maddison PJ, McCubbin VR, Wolfson-Reichlin M et al. (1994).**  
Concentration of autoantibodies to native 60 kD Ro/SS-A and 52-kD Ro-SS-A in eluates from the heart of a child who died with congenital complete heart block. *Arthritis Rheum.*; 37: 1698-703.
- [15]: **Albarède S, Guyarda A, Burga E, Dumonta G, NgaPhamb B. (2009).**  
Le contrôle national de qualité: l'exemple de l'immunopathologie. *Rev Franc Lab*; 416:87-91.
- [16]: **Amoura Z., Diemert M.C. (2010).**  
Conduite à tenir devant une recherche d'anticorps anti-nucléaires positive *Médecine Thérapeutique*, 4 : 801-805.
- [17]: **Lamand R. (1996).**  
Etude de la sero-conversion par les techniques d'immunofluorescence indirecte, de dot-blot et de western-blot de chien infecté naturellement et expérimentalement par *Leishmania infantum*. These de doctorat veterinaire, Faculte de medecine Claud Bernard, Lyon, 91p+annexes.
- [18]: **Wold RT, Young FE, Tan EM, Farr RS. (1968)**  
Desoxyribonucleic acid antibody: a method to detect its primary interaction with desoxyribonucleic acid. *Science*; 161: 806 -7.
- [19]: **Johanet C, Soulié E, Absalon YB, Ocwieja T. (1991).**  
Abuaf N. Évaluation d'une technique radioimmunologique pour la détection des anticorps anti-ADN natif. *Ann BiolClin.*; 49: 309 -12.
- [20]: **Hoffingsworth P.N., Pummer S.C., Oawkins R.L. (1996).**  
Antinuclear antibodies, in: Peter J.B., Shoenfeld Y. (Eds), *Autoantibodies*, Elsevier, Amsterdam pp.74-90.
- [21]: **Renier G, Mattmann S. (2000).**  
L'autoimmunité au quotidien, *Rev. Fr. Lab.* 327: 75-82.
- [22]: **Adams B.B., Mutasim D.E. (2000).**  
The diagnostic value of anti-nuclear antibody testing, *Int. J. Dermatol* 39: 887-891.
- [23]: **Wananuku S, Voramethkul W., Kaewopss Y, Hanvivatvong O. (2005).**  
Prevalence of positive antinuclear antibodies in healthy children, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 23: 153-157.

**[24]: Aubin J.E., Osborn M., Franke W.W., Weber K. (1980).**

Intermediate filaments of the vimentin-type and the cytokeratin-type are distributed differently during mitosis, *Exp. Cell. Res.* 129: 149-165.

**[25]: Helen Chapel, Mansel. (2006).**

Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas cliniques.

**[26]: Fekia S, Frikhab F, Ben Hadj H, Abeda S, Ben Ayeda M, Turkic H, Hachichad J, Bakloutie S, Bahloulb Z, Masmoudia M.(2012)**

Suites opératoires en rééducation après arthroplastie du genou : étude rétrospective à propos de 90 patients.