



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

-----oOo-----

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

-----oOo-----



Université Mouloud MAMMERY Tizi-Ouzou
Faculté de médecine
Département de Pharmacie

جامعة مولود معمري تيزي وزو
كلية الطب
فرع الصيدلة

MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION D'UN
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté et soutenu publiquement

Le : 14 Juillet 2020

Thème

**Evaluation de la technique ELISA appliquée à
l'exploration immunologique des connectivites**

Réalisé par :

BOURNINE Meriem
HAROUS Sara

OUSAIID Sabrina
SADOU Mohamed Lamine

Encadrés par :

Dr. TOUDERT Amar

Composition du Jury :

Dr. DAHMANI Dalila

Dr. KABRI Lynda

Dr. TOUDERT Amar

M.A.H. U Faculté de médecine

A.H CHU NEDIR Mohamed, T.O

M.A.H. U Faculté de médecine

Présidente de jury

Examinatrice

Encadreur

Remerciement

Dieu tout puissant, merci de nous avoir donné le courage, la force, la patience et la détermination d'accomplir ce modeste travail.

A notre promoteur,

Dr.TOUDERT Amar, Maitre-assistant Hospitalo-Universitaire en Immunologie

Nous vous remercions d'avoir dirigé et veillé au bon déroulement de notre mémoire. Ce fut un grand plaisir de travailler sous votre encadrement. Nous vous exprimons notre gratitude et notre reconnaissance à travers ce travail pour l'attention, la patience et de l'implication dont vous avez fait preuve.

Aux membres de notre jury, merci pour l'effort fourni afin d'évaluer notre travail :

Au Dr. DAHMANI D. Maitre-assistante Hospitalo-Universitaire en Biochimie

C'est avec un immense honneur que nous vous voyons présider le jury d'évaluation de ce mémoire. Nous tenons à vous exprimer nos profondes gratitude pour la confiance que vous nous avez accordée en nous autorisant l'accès à votre laboratoire, soyez rassuré cher maitre de nos sincères reconnaissances.

Au Dr. KABRI L. Assistante Hospitalo-universitaire en Immunologie

Merci de nous faire honneur en faisant parti de ce jury. Nous vous exprimons reconnaissance et respect pour tout ce que vous nous avez donné afin de réaliser ce modeste travail.

Nous remercions également le personnel du laboratoire de Biochimie, en particulier **Dr BELKADI Redouane résident en Biochimie** pour tous les efforts fournis afin de nous aider lors de la récolte des données ainsi que pendant la phase d'analyse des prélèvements de la partie pratique de notre étude.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à l'ensemble du corps enseignant, notamment au Pr. **MAMOU M, MCA en Chimie Analytique**. Ainsi qu'au **Dr. Benssaid H, MAHU en Chimie Analytique** pour leur contribution scientifique a la réalisation de ce travail.

A tous nos camarades et amis, milles merci pour votre soutien et vos encouragements, nous y sommes enfin parvenus !

Dédicace

*Je ne peux commencer mes remerciements sans le mot de Dieu
Dieu merci de m'avoir offert les personnes à qui je dédie ce travail.*

*A mes parents très précieux qui m'ont donné vie et n'ont cessé de rendre
mon chemin praticable, par leur amour inégalé, leur éducation, leur
inestimable soutien et bienveillance, leurs innombrables sacrifices qui
ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, nul ne peut exprimer mes
reconnaisances. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A mes deux petits frères, merci pour votre soutien plus que précieux,
vos encouragements génèrent en moi la motivation et l'envie de toujours
me surpasser et à avoir toujours plus de réussites, j'espère être un
meilleur exemple pour vous.*

*A mes très chers grands parents cheikh Ali et Zhor, ceci est
l'expression de ma profonde gratitude pour votre amour, votre soutien,
vos conseils qui m'ont toujours poussés à chercher, chercher pour
découvrir, découvrir pour toujours viser plus loin. Que ce travail soit le
meilleur cadeau que je puisse vous offrir.*

*A mes tantes Salima et Naziha, j'espère avoir été à la hauteur, Il est vrai
qu'après tout être un si bon pharmacien comme vous l'êtes est loin d'être
facile. Je vous remercie du fond du cœur.*

*A toi Amine, merci pour tes encouragements, ton soutien sans égal. Moh Zt, si
ça ne tenait qu'à moi, ma soutenance aurait eu lieu à Paris pour que tu
puisses y assister, merci pour tout mon frère.*

*A tous mes amis, Samia, Ahmed, Juba et Nesrine, Je ne saurais
comment vous remercier pour tout votre soutien, milles mercis à vous.*

*Une dédicace assez particulière à une personne
particulière Yasmine.*

Mohamed Lamine



BONTONTV

Dédicace

Avant tout, je remercie le Bon Dieu de m'avoir donné la chance d'étudier la santé, la force, la volonté et la patience pour mener à bien ce travail.

Je dédie ce modeste travail :

A vous mes parents Ahmed et Hakima. Le peu de temps que je vous consacre est bien loin d'être le reflet de ce que je ressens. Bien que j'aie pleuré devant vous lors de mon premier jour à l'université, aujourd'hui ça me reste un pas est mon rêve d'enfance d'être pharmacienne soit réaliser. Grâce à votre amour, conseil, soutien et encouragement que j'ai pu parcourir ce long chemin sans trop sentir du sacrifice. Je vous aime de tout mon cœur.

A mon grand-père Houcine qui n'a jamais cessé de me dire < concentre toi bien sur tes études ma fille >. Et à la mémoire de mon grand père Ahmed qui m'a appris mes premiers mots de français.

A mon frère Adem et mes deux adorables sœurs Asma et Hadjer. Merci pour vos encouragements

A ma tante Wahiba, merci pour ton amour et ton soutien.

A mes 6 petits anges : Issam, Alae, Wassim, Hanin, Sami et Halla, votre simple sourire me remplit de gaieté. Je vous adore

A toi mon précieux cadeau et mon nouveau pilier dans cette vie Slimane, et à ma nouvelle famille Mallek.

A une autre sœur que la vie a oublié de me donner. Ensemble et pendant 6 ans d'études, j'ai partagé avec toi mes rires, mes larmes. Merci énormément ma fidèle amie Meriem.

A vous Sabrina, Lamine et Meriem, avec vous j'ai partagé des moments inoubliables pendant et en dehors ce travail.

A tous mes amis d'enfance, du lycée et d'université avec qui j'ai partagé de merveilleux souvenirs.

Sara

BONTONTV

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut ni pour exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance.

Je dédie cette thèse

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

A mes frères Mohamed, Yacine, Rabah Abderrahmane et Sid Ahmed qui font l'ensemble de ma famille, qui m'ont soutenue et encouragé en leur souhaitant la réussite et tout le bonheur du monde.

A mes deux grands-mères et aux âmes des mes grands pères aussi et tous les membres de ma grande famille.

A mon fiancé Dr Chayeb Saïd pour son soutien et encouragement et à toute ma belle famille.

A tous les enseignants qui m'ont aidé à tracer le chemin de réussite, j'espère que vous trouvez dans ce travail l'expression de mon estime et mes sincères remerciements.

Et à tous mes amis et collègues avec qui j'ai partagé les meilleurs moments.

Merci à vous tous.

Sabrina



Dédicace

Je dédie ce travail

À mon grand-père ma terre d'accueil, homme d'exception qui m'a toujours inspiré persévérance dévouement, mais plus que ça, sa douceur exceptionnelle m'a accompagné chaque matin et chaque moment de mon cursus.


À la mémoire de ma grande mère, femme d'exception, elle m'a toujours inspiré force courage et patience, à celle qui m'a appris à toujours donner le meilleur de moi-même.

À mes chers parents qui m'ont soutenu dans mes choix et orientations, À mon père Hassene pour ses sacrifices, son implication et son dévouement sans lesquels je n'aurai pas pu être ce que je suis.

À maman Malika terre d'origine, terre fertile, à celle qui m'a tout donner et tout appris, ta force et ta douceur m'ont forgé et m'ont guidé, ton amour inconditionnel rayonnera pour toujours au plus profond de mon cœur.

À Zemtou Kahina pour tous les heureux moments qu'on a pu partager, merci pour ton écoute, ta présence, ton soutien et pour ton humour piquant.





À khaltou Fatiha terre de recharge, ma deuxième maman d'amour, je te remercie pour ta présence et ton soutien ta douceur a toujours été comme une brise maritime sur mon cœur.

À mes deux frères, à Youcef mon ami d'enfance et mon soutien à Ibrahim mon rayon de bonheur.

À mon amie et sœur Sara, à celle qui a apporté des couleurs tout au long de ces six années, Sara j'ai passé des moments inoubliables Avec toi, merci de m'avoir apporter toute cette amitié.

À mes tantes en particulier ma tante Kamélia, mes oncles, mes cousines et cousins merci pour vos encouragements.

À l'ensemble des membres de notre quadrinôme : Sara, Lamine, Sabrina pour tous leurs efforts, leur patience, leur assiduité leur courage sans lequel ce travail n'aura pas pu aboutir.

À toutes mes amies en particulier : Meriem, Selma, Hanane, Sara, Fatma.

"الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات"

Meriem



LISTE DES ABREVIATIONS

AAc : Auto-anticorps.

AAN :Anticorps anti-nucléaire.

Ac :Anticorps.

ACPA : Anticorps anti protéines citrullinées.

ACR : American Collège of Rhumatologie (Collège américain de rhumatologie).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNdb : Acide désoxyribonucléique double brin .

AECG : American European Consensus Group (Groupe de consensus européen) américain.

AG : Antigène.

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien.

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation de l'Environnement et du Travail.

Anti-CCP : Anti-peptides cycliques citrulinées.

Anti-PCNA : Anti proliferating cell nuclear antigen (Antigène nucléaire anti-prolifération cellulaire).

APRIL : A proliferation-inducting ligand (Un ligand induisant la prolifération).

ARN : Acide ribonucléique.

BAFF : b-cell activating factor (Facteur d'activation des cellules béta).

CBP : Cirrhose biliaire primitive.

CD : Cluster of differenciation (Cluster de différenciation).

CK : Créatine kinase.

CLSI : ClinicalLaboratory Standards Institue (Institut des normes de laboratoire clinique).

CMV : Cytomégalo Virus.

CPA : Cellule présentatrice d'antigène.

CREST : Calcinose sous-cutanés de Raynaud, atteinte œsophagienne, sclerodactylie, télangiectasies.

CRP : Protéine C Réactive.

CTGF : Connective Tissue Growth Factor (Facteur de croissance du tissu conjonctif).

CV : Coefficient de variation.

DM : Dermato-myosite.

DO : Densité optique.

EBV : Epstein-Barr Virus.

EIA : Enzyme immuno assay (Test immuno-enzymatique).

ELISA : Enzyme linked immuno sorbent assay (Dosage immuno-enzymatique).

ENA : Extractable nuclear antigen (Antigène nucléaire extractible).

EUCALB : European Concerted Action on Lyme Borreliosis (Action concertée européenne sur la borréliose de Lyme).

EULAR :European League Against Rheumatologie (Ligue européenne contre la rhumatologie).

FAN : Facteur anti nucléaire.

FDA : Food and Drug Administration.

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine.

FN : Faux Négatif.

FNS : Formule de numérotation sanguine .

FP : Faux positif.

FR : Facteur rhumatoïde.

gp210 : Glycoprotéine 210.

Hep2 : Human epithelial cell line type2 (Lignée cellulaire épithéliale humaine de type 2).

HLA : Antigène des leucocyte humain (Antigène des Leucocyte Humain).

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire.

HRP : Horseradish peroxidase.

ICH : International Council for Harmonisation (Conseil international pour l'harmonisation).

IFCC : Fédération Internationale de Chimie Clinique.

IFCC-LM : Fédération Internationale de Chimie Clinique et de Médecine de Laboratoire.

IFI : Immunofluorescence indirecte.

Ig : Immunoglobuline.

IL : Interleukine.

INF-alfa : Interféron-alfa.

INK : Interquartile.

IR : Intervalle de référence.

ISO : Organisation internationale de normalisation.

kD: kilo-Dalton.

LB : Lymphocyte B.

LED : Lupus erythémateux disséminé.

LES : Lupus erythémateux systémique.

LT : Lymphocyte T.

MAI : Maladie auto immune.

MCP : Monocyte chemo-attractant protein (Protéine chimio-attractive pour les monocytes).

MCTD : Mixed connective tissue disease (Maladie des tissus conjonctifs mixtes).

Me : Médiane.

MII : Myopathie inflammatoire idiopathique.

MMP : Métalloprotéinase.

PM : Poid moléculaire.

PNN : Polynucléaire neutrophile.

PR : Polyarthrite rhumatoïde.

PRA : Pourcentage de réactivité.

PTGF :Platelet-derived growth factor (Facteur de croissance dérivé des plaquettes).

RNP :Ribonucléo-proteine.

SAPL : Syndrome des anticorps anti-phospholipides.

SDS : Sodium dodécylsulfate.

ScS : Sclérodémie systémique.

Se : Sensibilité.

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutique..

SGS : Syndrome Gougregot Sjogren.

Sp : Spécificité.

TGF-beta : Transforming growth factor beta (Transformateur de facteur de croissance-beta).

TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine.

TNF : Facteur de nécrose tumorale.

UA : Unité arbitraire.

UE : Unité enzymatique.

UI : Unité internationale.

UV : Ultraviolet.

VN : Vrai négatif.

VP : Vrai positif.

VPN : Valeur prédictive négative..

VPP : Valeur prédictive positive .

VS : Vitesse de sédimentation.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères de classification du lupus érythémateux disséminé	7
Tableau 2 : Les atteintes extra glandulaires du SGC	11
Tableau 3 : Critères de Syndrome de Gougerot-Sjögren du groupe de consensus americano europeen 2002	11
Tableau 4 : Critères de diagnostic de la sclérodermie systémique	15
Tableau 5 : Critères de diagnostic de la polymyosite.....	17
Tableau 6 : Critères de diagnostic de la PR selon ACR/EULAR 2009	20
Tableau7 : Tableau récapitulatif des auto-Ag nucléaire avec leurs structures et fonction biologique.....	26
Tableau 8 : Anticorps marqueurs de MAI reconnus comme critères de classification /diagnostiques internationaux.....	31
Tableau9 : Avantage et inconvénients de la technique d'Immunofluorescence Indirecte....	35
Tableau 10 : Avantage et inconvénients de la technique ELISA	37
Tableau 11 : Avantage et inconvénients de la technique Radio-immunologique(Farr).....	41
Tableau 12 : Avantage et inconvénients de la technique Immunodot.....	44
Tableau 13 : Avantage et inconvénients de la technique Immunoblot.....	45
Tableau 14 : Avantage et inconvénients de la technique Ouchterlony.....	46
Tableau 15 : Avantage et inconvénients de l'élécrosynérese.....	47
Tableau 16 : Avantage et inconvénients de la technique Technologie Luminex.....	49
Tableau 17 : Tableau de contingence2*2.....	53
Tableau 18 : Répartition des réactifs dans les coffrets ELISA.....	70
Tableau 19 : Interprétation des titres des anticorps-ANA obtenus.....	74
Tableau 20 : Interprétation des titres des anticorps-ADN db obtenus.....	77

Tableau 21 : Interprétation des titres des anticorps anti- ENA obtenus.....	79
Tableau 22 : Les différentes tranches d'âge avec le pourcentage des individus incriminés dans l'étude de la spécificité.....	84
Tableau 23 : Représentation tabulaire des concentrations en AAN des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité.....	86
Tableau 24 : Représentation tabulaire des concentrations en AAN des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la fidélité intermédiaire.....	87
Tableau 25 : Représentation tabulaire des concentrations en AAN des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la spécificité.....	88
Tableau 26 : Tableau de contingence 2*2 pour le calcul de la sensibilité et la spécificité de la technique ELISA.....	90
Tableau 27 : Représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti-DNA des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité.....	91
Tableau 28 : Représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti-DNA des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la spécificité.....	92
Tableau 29 : Représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti-DNA des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la spécificité.....	93
Tableau 30 : Représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti- antigènes solubles des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité.....	94
Tableau 31 : Représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti- antigènes solubles des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la fidélité intermédiaire.....	95
Tableau 32 : Données quantitatives et qualitatives des 20 échantillons des individus de référence.....	96
Tableau 33 : Représentation tabulaire des principales données statistique de notre population de référence.....	98
Tableau 34 : Comparaison des CV moyens de la répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenus par notre étude avec ceux de Inova Diagnostics dans le cadre de l'évaluation de la technique ELISA appliquée au dépistage des AAN.....	101

Tableau 35 : Comparaison des CV moyens de la répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenus par notre étude avec ceux de Inova Diagnostics dans le cadre de l'évaluation de la technique ELISA appliquée au dosage des Ac anti-ADN db.....	101
Tableau 36 : Comparaison des CV moyens de la répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenus par notre étude avec ceux de Inova Diagnostics dans le cadre de l'évaluation de la technique ELISA appliquée à l'identification des Ac anti-antigènes solubles.....	103
Tableau 37 : Tableau de contingence 2*2 qui exprime les résultats de détection des ANA par ELISA en prenant l'IFI comme GOLD-STANDARD.....	105
Tableau 38 : Tableau de contingence pour la comparaison des méthodes de criblage AAN.....	107
Tableau 39 : Résultats de différentes études faites sur la sensibilité et spécificité de l'ELISA.....	108

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Lupus discoïde, rougeurs en ailes de papillon.....	7
Figure 2 : Classification des différentes formes de la sclérodermie systémique.....	12
Figure 3 : Les différents antigènes nucléocytoplasmique.....	26
Figure 4 : La démarche de la recherche des AAN.....	32
Figure 5 : Principe de la technique d'immunofluorescence indirecte.....	34
Figure 6 : Schéma globale sur les aspects de la fluorescence les autoanticorps et les maladies associées à chaque type de fluorescence.....	35
Figure 7 : Principe du test ELISA indirect.....	37
Figure 8 : <i>Crithidia luciliae</i>	38
Figure 9 : Technique IFI sur <i>Crithidialuciliae</i>	39
Figure 10 : Anticorps anti-ADN positifs sur <i>Crithidia luciliae</i>	39
Figure 11 : Technique radio-immunologique (test de Farr).....	40
Figure 12 : Technique immuno-enzymatique ELISA.....	41
Figure 13 : Principe de la technique d'immunodot.....	43
Figure 14 : Principe de la technique d'immunoblot.....	44
Figure 15 : Principe de la technique d'Ouchterlony.....	46
Figure 16 : Principe de la Technologie Luminex.....	48
Figure 17 : Les trois niveaux de la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité) selon une variabilité croissante.....	57
Figure 18 : Relation entre les différents termes employés dans la définition du concept des valeurs de références.....	62
Figure 19 : Algorithme des actions permettant de valider un intervalle de référence préexistant selon la ligne directrice C28-A3publiee par le CLSI et l'IFCC	66
Figure 20 : Incubateur agitateur.....	69

Figure 21 : Laveur automatique.....	69
Figure 22 : Lecteur spectrophotomètre UV-Visible et logiciel de traitement des résultats.....	69
Figure 23 : Microplaque ELISA à puits recouverts d'antigènes ADN db.....	75
Figure 24 : Courbe de calibration obtenue lors d'un test ELISA anti-ADN db.....	76
Figure 25 : Microplaque ELISA a puits recouverts d'antigènes ENA.....	78
Figure 26 : Schéma général sur la méthode de traitements des échantillons destinés à être analysés par la technique ELISA pour la vérification d'une valeur de référence.....	82
Figure 27 : Répartition de la population d'étude selon les tranches d'âge.....	84
Figure28 : Répartition des individus de la population d'étude selon le sexe.....	85
Figure 29 : Répartition des échantillons selon la nature de résultat.....	88
Figure 30 : Répartition des échantillons selon la nature de résultat.....	93
Figure 31: Répartition des individus de référence selon l'âge.....	96
Figure 32 : Répartition des individus de référence selon le sexe.....	97
Figure 33 : Répartition des individus de référence selon la nature de résultat.....	97
Figure 34 : Boite à moustache qui représente la répartition de nos 20 individus de références.....	99

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	i
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	viii
Introduction générale et problématique	1

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : CONNECTIVITES ET AUTOANTICORPS ANTI-NUCLEAIRE

1-Les connectivites.....	3
1.1-Définition.....	3
1.2-Facteurs influençant.....	3
1.2.1-Facteurs de risques génétiques.....	3
1.2.2-Facteurs environnementaux.....	4
1.3-Classification	4
1.3.1- Lupus Erythémateux Systémique.....	4
1.3.2-Le syndrome de Gougerot-Sjögren.....	8
1.3.3- La sclérodermie systémique.....	12
1.3.4-La Polymyosite.....	16
1.3.5.La Polyarthrite Rhumatoïde.....	18
1.3.6-Les Connectivites Mixtes.....	21
2-Les anticorps anti-nucléaires.....	24
2.1-Historique.....	24
2.2-Définitions	24
2.2.1- Les autoanticorps.....	24
2.2.2- Les auto-antigène.....	25
2.3-Rôle des AAN dans la pathogenèse des MAI systémiques.....	27
2.3.1-Production des AAN.....	27

2.3.2-AAN dans la genèse des lésions.....	27
2.4-La valeur clinique des auto-anticorps anti-nucléaires.....	27
2.4.1-Valeur clinique des anti-antigènes nucléaire insolubles.....	29
2.4.2-valeur clinique des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles.....	29
2.4.3-la valeur clinique des anticorps anti-centromère.....	30
2.4.4-la valeur clinique des anticorps anti membrane nucléaire.....	31
2.5- Les Indications de la recherche des auto-anticorps antinucléaires.....	31

CHAPITRE II : EXPLORATION IMMUNOLOGIQUE DES CONNECTIVITES

1- Les techniques utilisées pour le dépistage des Anticorps Anti-Nucléaires	33
1.1-La technique Immunofluorescence indirecte	33
1.1.1Principe	33
1.1.2-Interprétations des résultats.....	34
1.1.3- Les avantages et inconvénients	35
1.2-La technique ELISA	36
1.2.1- Principe	36
1.2.2- Interprétation des résultats.....	36
1.2.3- avantages et inconvénients	37
2- Les techniques utilisées pour le dosage des Anticorps Anti-ADN.....	38
2.1- L'immunofluorescence indirecte sur <i>Crithidia luciliae</i>	38
2.1.1-Principe.....	38
2.1.2- Interprétation des résultats.....	39
2.2- Test de Farr.....	40
2.2.1- Principe.....	40
2.2.2- Interprétation des résultats.....	40
2.2.3-Avantages et inconvénients	41
2.3- Technique ELISA	41
2.3.1-Principe.....	41

2.3.2- Interprétation des résultats.....	42
3- Les techniques utilisées pour l'identification des Anticorps dirigés contre les Ag Solubles.....	42
3.1- Technique ELISA.....	42
3.1.1-Principe.....	42
3.1.2-Interprétation des résultats.....	42
3.2- Immunodot	42
3.2.1-Principe.....	42
3.2.2-Interprétation des résultats.....	43
3.2.3-Avantages et Inconvénients	44
3.3- Immunoblot.....	44
3.3.1- Principe.....	44
3.3.2-Interprétation des résultats.....	45
3.3.3- Avantages et inconvénients.....	45
3.4- Immunodiffusion double d'Ouchterlony	45
3.4.1- Principe.....	45
3.4.2-Interprétation des résultats.....	46
3.4.3-Avantages et inconvénients.....	46
3.5- L'électro-synérèse.....	47
3.5.1- Principe.....	47
3.5.2-Interprétation des résultats.....	47
3.5.3- Avantages et inconvénients.....	47
3.6- Technologie Luminex.....	47
3.6.1-Principe	47
3.6.2-Interprétation des résultats	48
3.6.3-Avantages et inconvénients.....	49

CHAPITRE III : EVALUATION D'UNE TECHNIQUE D'ANALYSE

1-Indicateurs de performance d'un test diagnostique.....	51
1.1-La validité intrinsèque.....	51
1.1.1-Définition.....	51
1.1.2-Calcul de la sensibilité et la spécificité.....	52
1.1.3-Interprétations des résultats.....	54
1.2- La validité extrinsèque ou valeurs prédictifs d'un test.....	55
1.2.1-Définition.....	55
1.2.2-Calcul de VPP et VPN.....	55
1.2.3-Interprétations	56
2-Fidélité.....	57
2.1-Notion de fidélité.....	57
2.1.1-Répétabilité	58
2.1.2-Reproductibilité intra-laboratoire.....	58
2.1.3-Reproductibilité inter-laboratoire.....	58
2.2-Modalité pratique d'étude de la fidélité.....	59
2.2.1- Répétabilité.....	59
2.2.2- Fidélité intermédiaire.....	59
2.3-Formule de calcul.....	59
2.4-Interprétations.....	59

CHAPITRE IV : TRANSFERT DE VALEURS DE REFERENCE

1-Terminologie.....	60
2-aspect réglementaire et recommandations.....	62
2.1-aspect réglementaire	62

2.2-Recommandation des organismes internationaux des intervalles de référence...	63
3-Protocole de transférabilité des intervalles de références.....	63
3.1-Comparaison de systèmes analytique.....	63
3.2-Comparaison de population.....	64
3.2.1-Méthodes subjective.....	64
3.2.2-Vérification de l'intervalle de référence.....	65

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

1-Type d'étude.....	67
2-Lieu d'étude	67
3-Période d'étude.....	67
4-Population d'étude.....	67
4.1-Echantillonnage.....	67
4.1.1-Sujets sains	67
4.1.2-Sujets malades	67
4.2-Modalités de recrutements.....	68
4.2.1-Sujets sains	68
4.2.2-Critères de sélections des sérums des sujets malades.....	68
5-Matériels.....	68
5.1-Matériels de prélèvements.....	68
5.2-Matériels d'analyse	68
5.2.1-Le consommable.....	68
5.2.2-Appareillage.....	69
5.2.3-Réactifs.....	70
6-Démarche de l'étude.....	71
6.1-Exploration immunologique des connectivites.....	71
6.1.1-Etape de Screening : Technique ELISA appliquée au dépistage des AAN....	71

6.1.2-Etape de dosage : Technique ELISA appliquée au dosage des anticorps anti ADN natif.....	74
6.1.3-Etape Identification : Identification des Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles ENA6.....	77
6.2-Paramètres étudiés.....	79
6.2.1-Paramètres de performance.....	79
6.2.2-Transfert et vérification des valeurs de références.....	81
7-Analyse statistique.....	83

CHAPITRE II : RESULTATS

1-Principales caractéristiques de la population choisie pour évaluer la spécificité de la technique ELISA screening et ELISA dosage.....	84
1.1-Répartition de la population selon l'âge.....	84
1.2-Répartition de la population selon le sexe.....	85
2-Les résultats de l'évaluation de la fidélité et de la spécificité de la technique ELISA.....	85
2.1-Résultats de l'évaluation de la fidélité et de la spécificité de la technique ELISA screening et étude comparative entre la technique IFI et ELISA.....	86
2.1.1-La fidélité.....	86
2.1.2-La spécificité.....	88
2.1.3-Etude comparative entre la technique immunofluorescence indirecte sur cellules Hep-2 et la technique immuno-enzymatique ELISA dans la recherche des anticorps antinucléaires.....	89
2.2-Résultats de l'évaluation de la fidélité et la spécificité de la technique ELISA appliquée au dosage des anticorps anti-DNA.....	91
2.2.1-La Fidélité.....	91
2.2.2--La spécificité.....	93
2.3-Résultats de l'évaluation de la fidélité de la technique ELISA appliquée à l'identification des anticorps anti- antigènes solubles ENA-6.....	94
2.3.1-La Fidélité.....	94
3-Résultats de la vérification et transfert des valeurs de références.....	96

3.1-Les valeurs obtenues.....	96
3.2-Caractéristiques de notre population.....	96
3.2.1-Répartition des individus de références selon l'âge.....	96
3.2.2- Répartition des individus de référence selon le sexe.....	97
3.2.3- Répartition des patients selon la nature de résultats de test ELISA.....	97
3.3. Dispersion des valeurs de références sur notre population de référence.....	98
3.4. Validation de l'intervalle de référence.....	99

Discussion

1-Analyse des résultats.....	100
1.1-La fidélité.....	100
1.1.1-Technique ELISA appliquée au dépistage des AAN.....	100
1.1.2-Technique ELISA appliquée au dosage des Ac anti-ADN db.....	101
1.1.3- Technique ELISA appliquée à l'identification des Ac anti-antigènes solubles.....	102
1.2-La spécificité	103
1.2.1-Technique ELISA appliquée au dépistage des AAN.....	103
1.2.2- Technique ELISA appliquée au dosage des Ac anti-ADN db.....	103
1.3-vérification et validation d'une valeur de référence.....	104
1.4-Comparaison IFI/Hep-2 Vs ELISA	104
2-Biais et contraintes de l'étude	109

CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS 110

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

ANNEXE I

ANNEXE II

ANNEXE III

ANNEXE IV

RESUME

ABSTRACT



**INTRODUCTION GENERALE
ET PROBLEMATIQUE**

Les Connectivites sont des maladies auto immunes non spécifiques d'organes. Deux critères permettent de les unifier dans un même groupe : leur caractère protéiforme (présence d'une multitude de signes cliniques) et les désordres immunologiques (responsables de l'altération du tissu conjonctif en divers sites anatomiques). Elles englobent le lupus érythémateux systémique, la maladie de Gougerot Sjögren, la sclérodermie systémique, les polymyosites, la polyarthrite rhumatoïde et les connectivites mixtes.

Ces pathologies ont un marqueur immunologique qui est la présence des auto-anticorps anti nucléaires, chaque anticorps est doté d'une spécificité antigénique et chaque spécificité est associée à des signes cliniques particuliers et donc à une maladie donnée. Leur recherche et caractérisation jouent un rôle important dans le diagnostic, pronostic et le suivi de ces maladies. C'est donc à partir du désordre immunologique que s'est édifiée la base de l'exploration immunologique des connectivites.

L'exploration immunologique des connectivites est subdivisée en deux étapes clés, une étape de recherche ou screening qui en cas de positivité est suivie d'une étape d'identification des cibles antigéniques.

Le dépistage des auto-anticorps nucléaires, peut s'effectuer par de nombreuses techniques à savoir l'immunofluorescence indirecte (technique de référence) sur cellules HEp-2, ELISA sur un extrait antigénique de la cellule HEp-2. L'identification à son tour peut être pratiquée par divers techniques comme l'ELISA, immun dot et l'immun blot.

En auto-immunité, afin d'obtenir des résultats concrets, il faut apprécier la cohérence entre les résultats fournies par les techniques de dépistage et les techniques d'identification d'une part et le contexte clinique d'autre part. Les résultats de ces tests peuvent ne pas être cohérents. La fiabilité de ces techniques est de ce fait, mise en question.

Au niveau du Laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalo-Universitaire de TIZI OUZOU, l'exploration immunologique des connectivites est faite par la technique ELISA. C'est dans ce cadre que nous avons initié notre étude, dont l'objectif principal est l'appréciation des performances analytiques de la technique ELISA et donc son aptitude à fournir des résultats concrets et fiables aux patients suivies au niveau de ce Laboratoire.

Les objectifs :

- **Objectif principal :**

Ce travail a principalement pour objectif l'appréciation des performances analytiques des techniques ELISA adaptées à l'exploration des connectivités, au niveau du Laboratoire de Biochimie du CHU de Tizi-Ouzou.

- **Objectifs secondaires :**

- Etude comparative entre la technique Immunofluorescence indirecte IFI sur cellules HEP-2 et la technique immuno-enzymatique ELISA pour le dépistage des anticorps antinucléaires.

- Vérification et validation de la valeur de référence de la technique ELISA utilisée dans l'unité d'immunologie au niveau du laboratoire de biochimie, du centre hospitalo-universitaire « Nedir Mohamed » pour le dépistage des auto-anticorps anti nucléaires.



LA PARTIE THEORIQUE



CHAPITRE I :
CONNECTIVITES ET AUTOANTICORPS
ANTI-NUCLEAIRES



Les maladies auto-immunes (MAI) sont des maladies chroniques et peuvent être définies comme la rupture de la tolérance du soi qui ainsi entraîne des lésions cellulaires ou tissulaires induites par des lymphocytes T et/ou des lymphocytes B produisant des auto-anticorps spécifiques à des auto-antigènes [1]. Les maladies auto-immunes sont fréquentes (prévalence 5%) et sont la troisième cause de morbi-mortalité dans les pays développés. Elles sont classées en deux groupes : MAI spécifiques, et non spécifiques d'organes ou systémiques à savoir : les Connectivites, Syndrome des anti phospholipides, Vascularites [1, 2].

1- Les connectivites

1.1- Définition

Le terme connectivite (anciennement collagénose) désignait initialement un ensemble d'affections ayant comme dénominateur commun des modifications anatomopathologiques du tissu conjonctif. [3].

Les connectivites sont des maladies auto-immunes non spécifiques d'organes. Cette appellation regroupe des affections responsables d'atteintes multi viscérales de présentations diverses [3].

1.2- Facteurs influençant

La conjonction de plusieurs facteurs environnementaux et génétiques rend le développement de la maladie possible [4]. Les principaux facteurs de risques incriminés au cours des MAI sont :

1.2.1-Facteurs de risques génétiques

Elles ont toutes une composante génétique. On note souvent une association ou une liaison avec divers marqueurs génétiques [2].

Parmi les exemples les plus marquants :

- Une Polyarthrite rhumatoïde (PR) associée à des allèles HLA de classe II [2] ;
- Des gènes du complément dont le déficit est associé au Lupus érythémateux systémique (LES) [2].



1.2.2-Facteurs environnementaux

Bien que l'événement déclenchant de la réponse auto-immune ne soit élucidé pour la plupart des MAI, il a été supposé qu'un facteur exogène en soit responsable [5].

-Micro-organismes : EBV, CMV [4] ;

-Facteurs physico-chimiques : les plus incriminées : Les radiations UV, Les médicaments (comme le procainamide), le tabac, le stress [4].

1.3- Classification

Devant le caractère protéiforme des signes cliniques, il est apparu nécessaire aux cliniciens d'essayer de regrouper les patients ayant un même groupe de symptômes sous un même diagnostic [3].

Les maladies regroupées sous le terme de connectivite sont :

- Lupus Erythémateux Systémique ;
- Syndrome de Sjögren (ou de Gougerot-Sjögren) ;
- Sclérodémie systémique ;
- Polymyosite / dermatomyosite ;
- Polyarthrite rhumatoïde ;
- Connectivite mixte (syndrome de SHARP).

1.3.1- Lupus érythémateux systémique

➤ Définition

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie inflammatoire chronique [6], protéiforme et spontanément grave [7] pouvant affecter de nombreux organes et dont les manifestations sont extrêmement variées. Cette affection est marquée par une succession de poussées s'accompagnant d'une altération de l'état général et de périodes de rémission [2].

Le lupus s'associe parfois au syndrome des anticorps anti phospholipides SAPL [7].

➤ Classification

On distingue 2 formes de lupus :

- Le lupus spontané : qui survient sans facteurs inducteurs, connus ou reconnus. On a deux formes :
 - Le lupus cutané (pur) : au cours duquel l'atteinte est limitée à la peau (sans risque



pour un organe vital) ;

- Le lupus systémique : peut toucher plusieurs organes ou appareils (la peau, les articulations, les reins, l'appareil cardio-vasculaire...).

- Le lupus induit : qui est provoqué par la prise prolongée de certains médicaments (la doxycycline, le Bactrim, les bêtabloquants, les antituberculeux et les anti-TNF) [8].

➤ **Epidémiologie**

La prévalence du lupus est de 0,03 % à 0,1 %. Il affecte majoritairement les femmes (neuf femmes pour un seul homme) entre 15 et 45 ans [9].

Les formes pédiatriques de lupus sont rares, mais elles existent (10 à 15% des lupus commencent avant 16 ans). Elles sont souvent sévères avec une atteinte rénale plus fréquente que chez l'adulte [8].

➤ **Physiopathologie**

On peut présenter les nombreux acteurs de la physiopathologie du LES :

Une anomalie de la clairance physiologique des corps apoptotiques et/ou une augmentation de leur production provoquent la stimulation des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCD). Leur activation entraîne alors une production inappropriée d'interféron- alpha ($IFN\alpha$). L' $IFN\alpha$ permet la différenciation des monocytes en cellules dendritiques myéloïdes (mCD), capables de phagocytter du matériel nucléaire et de présenter des auto-antigènes aux LT aboutissant à la production d'auto-anticorps par les plasmocytes capables de se lier aux auto-antigènes et ainsi de former des complexes immuns. Ces derniers vont ensuite pouvoir être reconnus et activés par la suite divers voies (à savoir le complément par voie classique, PNN, Macrophages, lymphocytes ...) [10].

➤ **Biologie**

- **Syndrome inflammatoire**

La VS est élevée au cours des poussées dans 80 à 100 % des cas.

La CRP s'élève peu au cours des poussées évolutives du lupus.

Des modifications du protidogramme traduisent soit l'existence d'un syndrome inflammatoire avec une hyper- α -2- globulinémie (30 % des cas), et parfois une hypoalbuminémie en l'absence même de syndrome néphrotique, soit une dysgammaglobulinémie polyclonale liée à l'activation de l'immunité humorale avec production de multiples anticorps [11].



- **Complément sérique, cryoglobuline, et complexes immuns circulant**

Une hypocomplémentémie est signalée chez 40 à 60 % des maladies lupiques.

La présence d'une cryoglobuline dans le sérum est rapportée chez 25 % des lupus rhumatologiques.

La détection des complexes immuns circulants présents dans 60 à 90 % des cas [11].

- **Cytokines et récepteurs des cytokines circulantes**

L'interleukine 6 (IL6) circulante est élevée au cours des poussées de la maladie, ainsi que le récepteur soluble de l'IL2. CD40 ligand soluble, Il en est de même de l'IL10 et de l'IL4 (cytokines TH2) et de l'IL15, IL16 et de cytokines pro-inflammatoires IL18, IL17, IL12, TNF α et IFN α [11].

- **Bilan rénal**

En cas d'atteinte rénale : élévation de la créatinine sanguine, protéinurie, hématurie et leucocyturie [12].

- **Auto-anticorps**

Les anticorps antinucléaires (AAN) : Les AAN constituent un marqueur biologique quasi constant (98 %) du LES [13].

Les Ac anti-ADN dB : Ils sont présents chez 70 % des lupus à un moment quelconque de l'évolution.

Anticorps anti-Sm (Smith) : Ils sont dirigés contre une famille de ribonucléoprotéines, peu fréquents (20 %) mais très spécifiques [13].

- **Troubles hématologiques**

-Une anémie, le plus souvent inflammatoire, est présente lors des poussées. Une anémie hémolytique auto-immune à test de Coombs IgG-complément, parfois révélatrice, est rencontrée dans 5 à 10 % des cas.



-Une leucopénie modérée. -Une thrombopénie périphérique parfois responsable d'un syndrome hémorragique cutanéomuqueux, plus rarement viscéral [14].

➤ **Clinique**

Le signe le plus évocateur est l'atteinte de la peau, qui touche 50 à 75% des patients au cours de l'évolution ; elle est favorisée par l'exposition au soleil.

Il peut s'agir :

- D'une Photosensibilité, Des rougeurs en « ailes de papillon » au visage, D'un lupus « discoïde » (rougeurs arrondies chroniques), accompagnées de squames (croûtes), qui laissent des cicatrices ;



Figure1 : Lupus discoïde (gauche), rougeurs en ailes de papillon (droite) [15, 16].

- Autres signes : fatigue, fièvre, arthralgie, des douleurs thoraciques, de l'essoufflement, pleurésie ou péricardite... [8]

➤ **Critères de diagnostic**

Le lupus peut être affirmé lorsque le patient présente au moins quatre des 11 critères de la classification de référence établie par l'American College of Rheumatology (ACR) retenus en 1982 et mis à jour en 1997 [9].

Tableau 1 : critères de classification du lupus érythémateux disséminé 1997 [9].

Tableau1 Critères de la classification de référence du lupus érythémateux disséminé	
◆ 1. Éruption malarique (masque de loup).	◆ 9. Atteinte hématologique.
◆ 2. Éruption de lupus discoïde.	◆ 10. Désordre immunologique (présence d'anticorps anti-acide désoxyribonucléique [ADN] natif ou d'anti-Sm, ou d'anti-phospholipides.
◆ 3. Photosensibilité.	◆ 11. Présence de facteurs antinucléaires à un titre anormal en l'absence de médicament inducteur.
◆ 4. Ulcérations buccales ou naso-pharyngées.	
◆ 5. Polyarthrite non érosive.	
◆ 6. Pleurésie ou péricardite.	
◆ 7. Atteinte rénale.	
◆ 8. Atteinte neurologique.	

Source : American College of Rheumatology (ACR).
www.rheumatology.org/



➤ **Pronostic**

L'évolution de la maladie susceptible de se compliquer par des manifestations viscérales sévères (notamment rénales et cardiaques) et un risque infectieux suite à l'utilisation des corticoïdes et des immunosuppresseurs [17].

➤ **Traitement**

- AINS et Corticoïdes (pour les atteintes articulaires).
- Antipaludiques de synthèse : hydroxychloroquine (Plaquenil®) : indiqué dans tous les cas, car effet favorable sur les atteintes articulaire, cutanée et sur le profil lipidique et la mortalité.

Sont également proposés comme traitement de fond car ils ont un effet préventif contre les rechutes [6].

- Immunosuppresseurs : Cyclophosphamide, azathioprine, Mycophénolate, dans les atteintes graves (néphropathie...).

Le méthotrexate peut être utilisé dans les formes articulaires rebelles.

- Biothérapies : Rituximab dans certains cas réfractaires. Belimumab dans les formes sévères à forte composante auto-immune.

1.3.2-Le syndrome de Gougerot-Sjögren

➤ **Définition**

Le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS) est une maladie auto-immune systémique caractérisée par une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines [18]. 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" souvent utilisée [19].

➤ **Classification**

Le SGS peut être primitif (isolé) ou secondaire associé à d'autres maladies auto-immunes (LES, SCS, MCTD, Maladie cœliaque...) [18].



➤ **Epidémiologie**

Sa prévalence est évaluée entre 0,5 et 1 % à prédominance féminine (9/1) [20], avec une moyenne d'âge entre 40 et 50 ans [18].

➤ **Physiopathologie**

Le processus pathogénique de cette maladie est complexe, multifactoriel. Le processus peut être initié par l'activation des cellules épithéliales glandulaires (salivaires, lacrymales...) avec surexpression de molécules de costimulation CD80/CD86 entraînant une infiltration lymphocytaire composée majoritairement de lymphocytes T (surtout des LT CD4 et aussi des LT CD8), mais aussi un recrutement des cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques (productrices d'IFN) et les LB. Cela induit l'activation de ces cellules immunitaires notamment les LB, ce qui aboutit à la production de plasmablastes et localement des auto-Ac anti-SSA et anti-SSB. D'où la destruction des cellules épithéliales [21].

➤ **Biologie**

- **Bilan inflammatoire**

Une VS élevée.

Une hypergammaglobulinémie polyclonale [22].

- **Bilan hématologique**

Une leuco-lymphopénie [22].

- **Bilan urinaire**

Acidose tubulaire.

Rarement, une protéinurie et une micro-hématurie dues probablement à une atteinte rénale [22].

- **Auto-Anticorps**

- Anti-SSA (Ro) dirigés contre diverses ribonucléoprotéines.

- Anti-SSB (La) reconnaissant une phosphoprotéine.



Ces auto-anticorps, quel que soit leur taux, constituent le seul critère biologique parmi les critères diagnostiques de l'American European Consensus Group (AECG). Ils ne sont pas spécifiques au SGS. A l'inverse, leur absence n'exclut pas un SGS [13,22].

➤ **Clinique**

Atteintes Glandulaires

- 1- Atteinte salivaire (xérostomie ou sécheresse buccale) : sensation de sécheresse accentuée en mangeant des aliments secs obligeant à boire pour avaler.
- 2- Atteinte oculaire (xérophtalmie ou sécheresse oculaire) : sensation d'irritation oculaire et de sable dans les yeux).

Atteintes Extra-Glandulaires

Dans le SGS, on observe des atteintes viscérales et des anomalies biologiques fréquentes (environ 70% des malades). Ces atteintes sont révélatrices dans 25% des cas et peuvent précéder le syndrome sec de plusieurs années. A l'inverse, celle-ci peuvent compliquer l'évolution d'un SGS et devraient être dépistées [23]. **Voir le tableau 2.**

➤ **Critères de diagnostic**

Le diagnostic repose sur la combinaison d'éléments cliniques subjectifs et objectifs, une imagerie, un examen histologique et des examens complémentaires qui sont :

- **Test de Schirmer** : La technique de choix pour l'Objectivation de la xérophtalmie (a l'aide d'une bandelette graduée). Selon l'AECG, la xérophtalmie est retenue en dessous de 5 mm / 5 minutes sans anesthésie [18] ;
- **La Sialométrie** : par recueil de salive totale de façon non stimulée. C'est la meilleure méthode pour l'Objectivation de la xérostomie. Selon l'AECG, la xérostomie subjective est retenue lorsqu'une sialométrie est < 1,5 ml / 15 minutes [18].

Les critères de diagnostic du SGS selon le groupe de consensus américano-européen 2002. **Voir tableau 3.**



Tableau 2 : Atteintes extraglandulaires du syndrome de Gougerot-Sjögren[18].

TABLEAU 2		Atteintes extraglandulaires du syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS)
Sans cause évidente, ces manifestations doivent faire suspecter un SGS ou une autre connectivite, surtout si elles sont associées à un syndrome sec. Celles désignées par un astérisque (*) sont rarement décrites dans le SGS primaire et doivent faire suspecter un chevauchement avec d'autres connectivites.		
Symptômes généraux	<ul style="list-style-type: none"> • Fièvre • Fatigue • Adénopathie 	
Symptômes vasculocutanés	<ul style="list-style-type: none"> • Phénomène de Raynaud* • Purpura sur cryoglobuline ou sur hypergamma-globulinémie (purpura de Waldenström) 	
Symptômes musculo-squelettiques	<ul style="list-style-type: none"> • Arthralgies migratoires, à caractère inflammatoire • Arthrites • Myalgies • Myosite 	
Symptômes rénaux	<ul style="list-style-type: none"> • Néphrite tubulo-interstitielle • Glomérulonéphrite 	
Symptômes cardiopulmonaires	<ul style="list-style-type: none"> • Pneumopathie interstitielle • Hypertension artérielle pulmonaire* • Péricardite* 	
Symptômes neurologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Atteinte neurologique centrale cérébrale ou médullaire • Méningite aseptique • Atteinte des nerfs crâniens • Neuropathie périphérique 	
Symptômes psychiatriques	<ul style="list-style-type: none"> • Dépression • Anxiété 	
Symptômes hématologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Leucopénie avec lymphopénie et/ou neutropénie • Thrombopénie immunitaire* • Test de Coombs positif, rarement accompagné d'une anémie hémolytique • Lymphome non hodgkinien de type B 	

Tableau 3 : Les critères de diagnostic du SGS selon le groupe de consensus américano-européen 2002[18].

TABLEAU 3		Critères du syndrome de Gougerot-Sjögren du groupe de consensus américano-européen 2002
Syndrome de Gougerot-Sjögren : quatre des six critères sont présents avec au moins le critère 5 ou 6.		
I – Symptômes oculaires (au moins un des trois critères suivants)		
<ul style="list-style-type: none"> • Sensation quotidienne, persistante et gênante des yeux secs depuis plus de 3 mois • Sensation fréquente de «sable dans les yeux» • Utilisation de larmes artificielles plus de 3 fois/jour 		
II – Symptômes buccaux (au moins un des trois critères suivants)		
<ul style="list-style-type: none"> • Sensation quotidienne de bouche sèche depuis plus de 3 mois • A l'âge adulte, glandes salivaires enflées de manière répétée ou persistante • Consommation fréquente de liquides pour avaler les aliments secs 		
III – Signes cliniques ophtalmologiques (au moins un des deux tests suivants positif)		
<ul style="list-style-type: none"> • Test de Schirmer ≤ 5 mm/5 minutes • Score de van Bijsterveld ≥ 4 		
IV – Atteintes des glandes salivaires (au moins un des trois tests suivants positif)		
<ul style="list-style-type: none"> • Scintigraphie salivaire • Flux salivaire sans stimulation • Sialographie parotidienne • $< 1,5$ ml/15 minutes 		
V – Histopathologie		
Sialadénite de score > 1 sur biopsie(s) de glandes salivaires accessoires (foyer : > 50 cellules mononucléées agglomérées; score = nombre de foyers sur 4 mm^2 de tissu glandulaire)		
VI – Autoanticorps		
<ul style="list-style-type: none"> • Anti-Ro (SS-A) • Anti-La (SS-B) 		
Critères d'exclusion		
<ul style="list-style-type: none"> • Antécédent d'irradiation cervicale • Réaction du greffon contre l'hôte • Infection par le VIH ou le VHC • Utilisation de médicaments anticholinergiques (après une période dépassant 4 fois la demi-vie) • Lymphome préexistant • Sarcoïdose 		

➤ Pronostic

Le syndrome de Gougerot-Sjögren s'installe et évolue très lentement. Il ne menace que très exceptionnellement le pronostic vital, et la survie moyenne des patients atteints ne diffère pas sensiblement de celle d'une population normale. On peut très schématiquement distinguer 2 formes de la maladie :

- Une forme chronique qui se limite au syndrome sec, à la fatigue et parfois à des douleurs diffuses ;
- Une forme évolutive ou systémique se caractérisant par la survenue au fil des années de plusieurs manifestations extra-glandulaires dont certaines peuvent être graves. Ces formes systémiques sévères concernent environ 15% des patients [24].

➤ Traitement

Il repose sur un traitement symptomatique (larme artificielle, salive artificielle, émoullients, sialagogues, antalgiques) et immunomodulateur / immunosuppresseur. Les antimalariques



sont utilisés pour limiter le syndrome sec et traiter les symptômes généraux avec une efficacité variable.

Il est parfois nécessaire de recourir à une corticothérapie et / ou à des immunosuppresseurs classiques. Les immunobiologiques ciblant préférentiellement les lymphocytes B, tels que le rituximab ou le belimumab, sont utilisés dans des cas réfractaires [18].

1.3.3- La sclérodémie systémique

➤ Définition

La sclérodémie systémique est une maladie auto-immune rare caractérisée par : une atteinte vasculaire [25] par épaissement de la paroi des artères et réduction du calibre [26], une fibrose pouvant toucher l'ensemble du corps, Des perturbations de système immunitaire (phénomène inflammatoire) et une production d'auto-anticorps [25].

➤ Classification

Il existe deux formes phénotypiques principales de ScS, une forme cutanée limitée où la sclérose cutanée ne touche que les extrémités des membres [27] (mains, pieds, et/ou visage) [25] on parle alors d'une atteinte distale et une forme cutanée diffuse qui s'étend vers la région proximale des membres et/ou du tronc [27] (remontent au-dessus des coudes et des genoux) [25]. Il existe aussi dans moins de 10% des cas des formes sans sclérose cutanée.

On parle alors de la ScS Sine scleroderma [27].

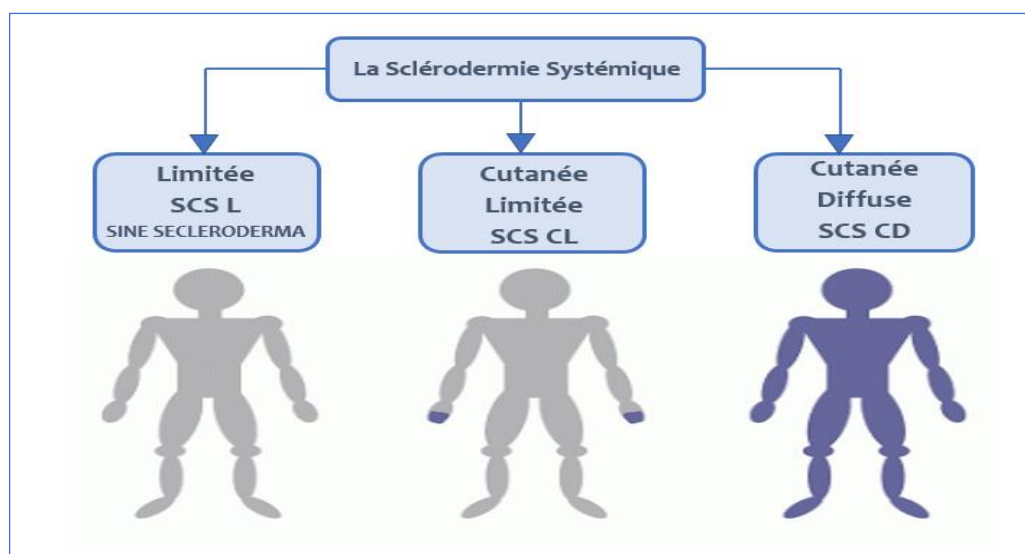


Figure2 : la classification des différentes formes de la sclérodémie systémique.



➤ **Epidémiologie**

Sa prévalence varie entre 30 à 240 cas par million d'habitants, avec des maximums en Amérique du nord et en Australie et une prévalence la plus basse en Asie (japon). Elle touche avec prédilection les femmes (3 à 8 femmes pour un homme). Elle peut survenir à tout Age mais se déclare le plus souvent entre 50 et 60 ans [25]. Chez les enfants, elle est extrêmement rare et représente moins de 5% de l'ensemble des ScS [27].

➤ **Physiopathologie**

La physiopathologie est caractérisée par trois éléments principaux, une dysrégulation immunitaire, une microangiopathie et une fibrose.

Une agression vasculaire engendre une activation des cellules endothéliales vasculaires qui conduit à :

- L'expression de molécules d'adhésion favorisant le recrutement de cellules inflammatoires ;
- La perturbation du contrôle du tonus et de la perméabilité vasculaires, dont l'origine est un excès de synthèse d'endothéline (vasoconstricteur puissant) et une moindre production de monoxyde d'azote et de prostacyclines [28] ;
- Un épaissement de la paroi des vaisseaux sous l'action de molécules pro-fibrosantes (TGF- β , Connective tissue growth factor (CTGF), platelet-derived growth factor (PDGF) et différentes autres cytokines et chémokines (monocyte chemo-attractant protein 1 :MCP1 IL-1, 4, 6, 13 et TNF α) qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses et la synthèse de composants de la matrice extracellulaire provoquant une fibrose vasculaire [28,29] ;
- Une raréfaction capillaire par l'oblitération des petits vaisseaux et une altération des mécanismes compensatoires : l'angiogenèse (croissance compensatrice de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux résiduels) et la vasculogenèse (formation de nouveaux vaisseaux de novo) [28,29].

Par ailleurs, on observe une fibrose, une des caractéristiques les plus importantes de la ScS au niveau de la peau, des poumons et d'autres organes, caractérisée par un dépôt excessif de matrice extracellulaire. Son origine est une activation transitoire des fibroblastes.



- Le TGF- β est un stimulateur très important de ce phénomène. De plus, il inhibe la dégradation de la matrice extracellulaire en diminuant la synthèse des métalloprotéinases (MMP) et en augmentant la synthèse des inhibiteurs des MMP [29].
- Les molécules pro-fibrosantes responsables de microangiopathies y sont en parallèle incluses [29].
- Des anticorps dirigés contre les fibroblastes ont le potentiel de les activer et d'être impliqués dans la pathogénie de la ScS [28,29].

➤ **Biologie**

- **Bilan inflammatoire**

Syndrome inflammatoire non spécifique (VS élevée, CRP élevée) [30].

- **Auto-anticorps**

Anticorps anti-topo isomérase I appelés aussi anti-Scl70 : Il s'agit d'anticorps dirigés contre la topo-isomérase de type 1. Ils s'observent dans 34 à 70 % des sclérodermies diffuses dont ils sont hautement spécifiques.

Anti-SSB (anti-ARN polymérase III).

Anti-centromères : Ils se rencontrent essentiellement au cours du syndrome de CREST (Sclérodermie systémique localisée) (80 à 100 % des cas) [13].

➤ **Clinique**

La ScS est une maladie systémique, son expression clinique est très variable d'un patient à l'autre, pouvant aller d'une atteinte cutanée distale à une atteinte cutanée étendue éventuellement associée à des atteintes de plusieurs organes. [31] De manière générale les symptômes les plus fréquents de la ScS sont : un phénomène de Raynaud, une fibrose cutanée, [32] œdème des mains, des douleurs articulaires et osseuses ...etc [25].

La sévérité de la maladie dépend de l'ampleur de l'atteinte et des organes touchés [25]. Une atteinte interstitielle pulmonaire survient dans 1/3 à la moitié des cas. L'HTAP et la crise rénale deux complications redoutables, surviennent dans 10% et 5% des cas, respectivement [31].



Dans la forme diffuse tous les signes apparaissent habituellement au même temps, par contre dans la forme limitée, le phénomène de Raynaud précède plusieurs années les autres signes et l'entrée de la ScS est souvent marquée par son aggravation [25].

➤ **Critères de Diagnostic**

Le diagnostic est difficile et long à établir, surtout en cas d'absence d'une fibrose cutanée [32].

Dans des travaux scientifiques, on utilise des critères de classifications qui viennent d'être mise à jour dans un travail Européen et Américain. Ces critères sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Les patients recueillant un score d'au moins 9 et n'ayant pas d'autres maladies pouvant induire une fibrose de la peau seront classés comme ayant une ScS.

Tableau 4 : les critères de diagnostic de la Sclérodémie systémiques [27].

Domaine	Critères *	Score #
Épaississement cutané (ne tenir compte que du score le plus élevé)	Épaississement cutané des doigts des mains s'étendant au-delà des articulations MCP	9
	Doigts boudinés	2
	Atteinte des doigts ne dépassant pas les articulations MCP	4
Lésions pulpaire (ne tenir compte que du score le plus élevé)	Ulcères pulpaire digitaux	2
	Cicatrices déprimées	3
Télangiectasies		2
Anomalies capillaroscopiques		2
Atteinte pulmonaire	HTAP et/ou fibrose pulmonaire	2
Phénomène de Raynaud		3
Anticorps spécifiques de la ScS	Anti-topoisomérase I	3
	Anticorps anti-centromères	
	Anti-ARN polymérase de type III	

Le score obtenu n'est en aucun cas un score de gravité [25].

➤ **Pronostic**

L'évolution et le pronostic de la maladie sont très variables et dépendent de la forme cutanée de ScS, de la présence d'atteintes viscérales et la réponse aux traitements prescrits [27].

En cas de ScS cutanée limitée, la progression de la maladie est plus lente, par contre en cas de ScS cutanée diffuse, le pronostic est souvent sévère à cause du risque élevé de complications



menaçant le pronostic vital. [33] Donc la mortalité est plus élevée dans les formes cutanées diffuses que dans les formes cutanées limitées de la maladie [27].

➤ **Traitement**

- Traitement De fond : souvent décevant. Méthotrexate voire Imatinib.
- Traitement symptomatique : (inhibiteurs calciques pour le phénomène de Raynaud, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion pour la prévention et traitement des crises rénales, AINS pour l'atteinte articulaire, Inhibiteurs de la Pompe à Proton, prokinétiques gastriques et antibiotiques pour l'atteinte digestive, l'hypertension artérielle pulmonaires doit être traitée soit par voie per os (Bosentan), par perfusion continue (Epoprostenol), ou par aérosols (Iloprost) [34].

1.3.4- La Polymyosite

➤ **Définition**

Les myopathies inflammatoires idiopathiques (MII), ou myosites, sont des maladies auto-immunes systémiques définies par un infiltrat inflammatoire des muscles striés associé à une faiblesse musculaire symétrique et parfois des myalgies [35].

➤ **Epidémiologie**

La polymyosite touche les adultes de tous les âges, mais pas les enfants [35].

La prévalence de la polymyosite a été estimée à 0.0215%, elle est plus élevée pour les femmes et les personnes âgées [36], Le sex-ratio est d'environ deux femmes pour un homme [37].

➤ **Physiopathologie**

Les modifications anatomopathologiques comprennent des lésions cellulaires et atrophies, avec des degrés variables d'inflammation [38].

La dermatomyosite est caractérisée par des dépôts d'immuns-complexes dans les vaisseaux et est considérée comme une vasculopathie médiée par le complément et par un mécanisme



humoral (Lymphocytes B et TCD4+). À l'inverse, la principale anomalie physiopathologique dans la polymyosite est une atteinte musculaire dépendante des lymphocytes T.

➤ **Biologie**

- **Polymyosite**

Taux sériques d'enzymes musculaires élevés (si les CK ne sont pas élevées, aminotransférases ou aldolases (qui sont moins spécifiques que les CK))

Les Ac antinucléaires (AAN) sont positifs dans 80% des cas : Anti-Jo-1[38].

- **Dermatomyosite**

Taux sériques d'enzymes musculaires élevés comme dans la polymyosite.

Les Ac antinucléaires (AAN) sont positifs dans 80% des cas : anti-hélicase/ATPase connu sous le nom d'anti-Mi-2 (considérés comme spécifiques de la DM) [38].

➤ **Clinique**

D'installation le plus souvent lente et progressive, en quelques semaines ou mois, la polymyosite se manifeste par une faiblesse des muscles proximaux parfois accompagnée de myalgies.

Des troubles de la déglutition sont possibles, par atteinte des muscles striés de l'œsophage, de la bouche et du pharynx. De même, peuvent apparaître des troubles respiratoires, primitifs (muscles respiratoires) ou secondaires (Fausses routes).

Ces localisations aggravent le pronostic [39].

➤ **Critères de diagnostic**

Tableau 5 : les critères de diagnostic de la polymyosite [40].

Critères diagnostiques des polymyosites proposés par Mastaglia et al [11]
I. Critères cliniques :
a. Début subaigu chez l'adulte
b. Déficit moteur : diffus, avec prédominance proximale
d. Manifestations systémiques, e.g. : dysphagie, synovite, pneumopathie interstitielle
II. Élévation des enzymes musculaires CPK
III. Autres critères paracliniques :
Électromyogramme :
nombreux potentiels spontanés provenant de fibres musculaires isolées, avec ou sans salves pseudomyotoniques.
IV. Biopsie musculaire :
e. Infiltrats inflammatoires composés de lymphocytes T CD8+, endomysiaux
f. Infiltrats inflammatoires dispersés T CD8+ entourant avec envahissement, des fibres musculaires non nécrotiques
g. Expression myocytaire diffuse du complexe CMH-I
h. Nécrose musculaire et régénération.



➤ **Pronostic**

La progression de la maladie s'avère très variable d'un patient à un autre mais semble être plus sévère en cas de présence de facteurs de mauvais pronostic (l'âge avancé, l'atteinte cardiaque, l'atteinte laryngo-pharyngés ...) nécessitant le recours aux immunosuppresseurs [39].

➤ **Traitement**

Le traitement de la DM repose essentiellement sur une corticothérapie systémique le plus souvent associée à un immunosuppresseur (méthotrexate ++, azathioprine) à titre d'épargne cortisonique. La rééducation tient une place essentielle [41].

1.3.5- La Polyarthrite Rhumatoïde

➤ **Définition**

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la maladie auto-immune dont la physiopathologie est la mieux connue car la plus étudiée. La PR est une maladie multifactorielle faisant intervenir des facteurs à la fois hormonaux, génétiques, environnementaux et immunologiques qui contribuent au développement d'une inflammation chronique de la membrane synoviale [42].

➤ **Epidémiologie**

On peut estimer que la prévalence générale de la PR oscille, selon les pays, entre 0,3 et 0,8 % de la population adulte, tous sexes confondus.

La PR peut survenir à tout âge, mais on l'observe surtout entre 40 et 60 ans. Elle est, à cet âge, quatre fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. Cette différence de sexe s'atténue progressivement avec l'âge au-delà de 70 ans. [43].

➤ **Physiopathologie**

Même si des progrès considérables ont été faits dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie, son origine reste toujours inconnue. Plusieurs facteurs interviennent dans le déclenchement de la maladie (phase de déclenchement) : des facteurs hormonaux, le terrain génétique prédisposé et des facteurs environnementaux. Lorsque tous ces facteurs sont réunis



ils activent une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée qui se traduit par une réaction inflammatoire exagérée, en particulier de la membrane synoviale (phase d'inflammation) : La synoviale rhumatoïde est en revanche infiltrée par des cellules comprenant principalement des macrophages, des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4+ qui s'organisent en agrégats lymphoïdes avec parfois des centres germinaux dont la structure rappelle celle d'un ganglion[44].

L'activation des synoviocytes conduit au phénomène auto-entretenu de prolifération synoviale non compensée par l'apoptose, et à la formation du pannus qui résulte de l'accrochage de synoviocytes et de lymphocytes au cartilage grâce à des molécules d'adhésion [45].

➤ **Biologie**

- **Bilan inflammatoire**

Un syndrome inflammatoire non spécifique dans 90% des cas. (Vérifié par la mesure de la VS et dosage de la CRP).

Anémie modérée d'origine inflammatoire (vérifiée par une FNS) [43].

- **Auto-anticorps**

Facteur rhumatoïde : a une spécificité de 75 à 85 % et une sensibilité de 70 à 80 %.

Anticorps anti- protéines citrullinées (ACPA) ou anti-peptides cycliquescitrullinés (anti - CCP).

Les anti-CCP sont précoces, extrêmement spécifiques (> 95 %) et leur sensibilité est de l'ordre de 60 à 70 % dans les PR de moins de 6 mois. Ils auraient une valeur prédictive, le titre d'anticorps étant corrélé à la sévérité de la maladie [43].

➤ **Clinique**

- Manifestations articulaires symétriques : arthralgies, arthrites, ténosynovites. Raideur matinale [43].

- Manifestations extra articulaires : adénopathies, nodules rhumatoïdes pleuropulmonaires, hématologiques, atteintes neuromusculaires, atteinte oculaire et oto-rhino-laryngologique, atteinte rénale [43].



➤ **Critères de diagnostic**

Devant une polyarthrite débutante avec des radiographies normales et en l'absence d'un diagnostic d'une autre maladie :

Le diagnostic de PR est posé si le score est ≥ 6 .

Tableau 6 : les critères de diagnostic de PR selon ACR/EULAR 2009[46].

Type d'atteinte articulaire (0-5)	
1 articulation moyenne ou grosse	0
2-10 articulations moyennes ou grosses	1
1-3 petites articulations	2
4-10 petites articulations	3
>10 articulations (au moins 1 petite articulation)	5
Sérologie (0-3)	
Ni FR ni ACPA	0
Au moins un test faiblement positif	2
Au moins un test fortement positif	3
Durée de la synovite (0-1)	
<6 semaines	0
>6 semaines	1
Marqueurs de l'inflammation (0-1)	
Ni CRP ni VS élevée	0
CRP ou VS élevée	1

➤ **Pronostic**

La PR, une fois installée, tend progressivement vers l'aggravation et l'extension des atteintes articulaires. Cependant, la PR est une maladie très hétérogène dont l'évolution est extrêmement variable d'un patient à l'autre. Il existe des formes sévères, avec soit des atteintes viscérales pouvant mettre en jeu le pronostic vital, soit des destructions articulaires rapides, sources d'un handicap fonctionnel important. À l'opposé, la PR peut être bénigne, pouvant soit guérir complètement, soit entraîner peu ou pas de gêne fonctionnelle [43].

➤ **Traitement**

- **Traitements médicamenteux**

- Traitements symptomatiques [47]
 - Antalgiques.
 - AINS (pour éviter la raideur matinale), en cas de contre-indications ils sont remplacés par les corticoïdes.
 - Des infiltrations peuvent être réalisées en cas de persistance de synovites localisées : Altim, Hexatrione.



- Traitements de fond

Méthotrexate, immunosuppresseurs, antipaludéens de synthèse, dérivés thiolés
Sels d'Or...

- **Traitements non médicamenteux** : Réadaptation fonctionnelle ou traitements
chirurgical.

1.3.6- Les Connectivites Mixtes

➤ Définition

Les connectivites mixtes (mixed Connective Tissue Disease MCTD) ou le syndrome de Sharp est une connectivite rare dans laquelle des signes cliniques de LES, ScS, PM et/ou de PR sont intriqués sans que les critères de diagnostic pour ses affections soient pour autant remplis [48]. Dans de nombreux cas, les symptômes caractéristiques de l'une de ses maladies, en particulier la ScS ou LES, finissent par l'emporter sur les autres. La connectivite mixte peut également apparaître avec le syndrome de Sjörger [48].

➤ Epidémiologie

La prévalence de la connectivite mixte est inconnue [48] mais une étude épidémiologique japonaise suggère une prévalence de 2.7% [49]. Elle survient chez les personnes de tout âge [48], mais la majorité des cas se présentant entre la deuxième et la troisième décennie de la vie. Elle touche 16 à 79 femmes pour 1 homme [49].

➤ Physiopathologie

La physiopathologie reste encore incomprise, elle peut être expliquée par un processus complexe.

En réponse à un stimulus extérieur et sous certaines conditions immunologiques, l'apparition d'antigènes (U)-RNP modifiés via une apoptose pourrait être le point de départ d'une réponse auto-immune pathologique et conduire à l'apparition de plusieurs autoanticorps dirigés contre les protéines des RNP (ribonucléoprotéine). Ces conditions dans la connectivite mixte



pourraient comprendre un défaut d'élimination des antigènes modifiés, une tolérance insuffisante des lymphocytes B et T aux antigènes modifiés et enfin les effets immunostimulateurs conférés aux protéines par leurs ARN [50].

➤ **Biologie**

- **Bilan Inflammatoire**

VS élevée.

CRP élevée [51].

- **Bilan Hématologique**

Une anémie dans 75% des cas, parfois secondaire à une hémolyse [51].

Une leucopénie/lymphopénie dans 75% des cas qui tend à être corrélée avec le degré d'activité de la maladie [51].

Une thrombocytopénie est plus rare [52].

- **Auto-anticorps**

La présence d'anticorps anti-(U1) RNP : dirigé contre un constituant du noyau cellulaire la Ribonucléoprotéine U1 [53].

Les anticorps anti-DNA natif et anti-Sm présents mais rares. [53].

Les facteurs rhumatoïdes sont présents dans 57% des cas. [53].

La présence d'anticorps anti-Scl70 traduit un chevauchement avec la sclérodermie systémique. [54].

- Les anticorps anti-SSA et anti-SSB traduit un chevauchement avec un syndrome de Sjôgren [54].

➤ **Clinique**

Les manifestations cliniques de la maladie sont très différentes d'une personne à l'autre. Sa présentation clinique initiale est souvent peu spécifique et inclut une asthénie, des myalgie/arthralgie et état fébrile.



Les symptômes cardinaux de la MCTD sont le phénomène de Raynaud, une tuméfaction des mains, des doigts d'aspect boudiné, une sclerodactylie et des synovites. Ces manifestations s'associent la plupart du temps à une ou plusieurs atteintes viscérales parfois sévères telles que HTAP, avec retentissement sur le pronostic vital [49].

➤ Critères de Diagnostic

Le diagnostic de la connectivite mixte repose sur la mise en évidence d'un ensemble de manifestation clinique et biologique. La CMTD peut être prise au début pour un lupus et le bon diagnostic ne se fait parfois qu'au bout de plusieurs années [55].

Les critères de classification selon Alarcon-Segovia incluent :

- Un élément sérologique : présence d'anticorps anti-RNP a un titre élevé. (> 1 :1600 en hémagglutination) ;
- Des critères cliniques : tuméfaction des mains, synovite, myosite, phénomène de Raynaud, acrosclerose avec ou sans atteinte sclérodermie proximal.

Le diagnostic de MCTD peut-être retenu si le critère sérologique et au moins trois critères sont remplis (exception faite de la triade tuméfaction des mains, acrosclerose, phénomène de Raynaud qui nécessite un critère supplémentaire pour permettre la distinction avec une sclérodermie) [49].

➤ Pronostic

Le pronostic de la MCTD est assombri par une mortalité pouvant atteindre 28%, mortalité qui s'avère liée en grand partie au développement d'une HTAP sur une vasculopathie proliférative [49].

➤ Traitement

Une corticothérapie par prednisolone est instaurée associée à un traitement vasodilatateur par nifédipine (Adalate®) et buflomédil (Fonzylane®).

L'évolution à un mois est favorable avec cicatrisation de la lésion pulpaire.

La corticothérapie est progressivement diminuée, une prise quotidienne de prednisolone (Solupred®) restant nécessaire afin d'éviter les poussées inflammatoires articulaires [56].



2- Les anticorps anti-nucléaires

2.1- Historique

- En 1944, John Haserick montra que le sérum des malades lupiques développe un facteur sérique.
- En 1954, le suisse Peter Miescher réussit à adsorber le facteur sérique avec des noyaux de cellules thymiques de veau, démontrant ainsi que le facteur LE est un anticorps antinucléaire.
- En 1957 le français Maxime Seligman montra que le sérum des lupiques provoque un précipité lorsqu'il est superposé à une solution d'ADN. Les anticorps anti-ADN étaient devenus le marqueur sérologique spécifique du lupus. Du fait de son importance, la recherche des anti-ADN a fait l'objet de nombreux travaux, et de nombreuses techniques ont été proposées.

Une autre découverte fait date dans l'histoire des anticorps antinucléaires ; il s'agit de la mise en évidence, en 1961 par l'équipe de J.R. Anderson à Glasgow, dans le sérum des malades atteints du syndrome de Sjögren, d'anticorps précipitant un extrait soluble de divers tissus. C'est le départ des travaux sur les anticorps anti-ENA (ExtractableNuclearAntigens). L'année suivante, d'autres anticorps précipitants sont mis en évidence dans le sérum des lupiques (appelés anti-lup), puis dans la sclérodémie (J.S. Beck, 1963). Un de ces anticorps sera identifié en 1966 par Eng. M. Tan sous le nom d'anti-Sm. Depuis, un grand nombre d'anti-ENA ont été caractérisés, certains étant des marqueurs spécifiques des connectivites [57].

2.2- Définitions

2.2.1- Les autoanticorps

Les autoanticorps ou auto-immunoglobulines, sont des protéines secrétées par des cellules immunitaires (plasmocytes) dont la principale propriété est de reconnaître "le soi" [58]. Il y a des autoanticorps : naturels (sujets sains, sujets âgés ...), induits par des médicaments, associé à des affections néoplasiques. Certains sont même très spécifiques d'une maladie auto-immune. [59].



On distingue schématiquement cinq catégories d'autoanticorps utilisés pour le diagnostic des MAI :

- Les anticorps antinucléaires (AAN) : ils sont des marqueurs des MAI non spécifiques d'organes comme le lupus ;
- Les anticorps anti-tissu ou anti-cellules : ce sont des marqueurs des MAI spécifiques d'organes ;
- Les anticorps anti-IgG : c'est le facteur rhumatoïde ;
- Les anticorps anti phospholipides : ce sont des marqueurs du syndrome des anti phospholipides ;
- Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles : ils sont dirigés contre différents enzymes cytoplasmiques [60].

Les AAN sont donc une variété d'autoanticorps reconnaissant un ou plusieurs des constituants du noyau. (Certains de ses antigènes sont cependant présents dans le cytoplasme) [61].

Ils constituent un groupe hétérogène d'auto-anticorps de spécificités diverses. On distingue deux sous-groupes : les anticorps spécifiques d'antigènes nucléaires insolubles (l'anti-DNA et l'anti-histone) et les anticorps spécifiques d'antigènes nucléaires solubles (anti-Sm, l'anti-RNp, anti-SSA et SSB). Comme ils peuvent être dirigés contre des organites nucléaires tels que le nucléole ou le centromère [62].

2.2.2- Les auto-antigène

Les auto-antigènes sont des constituants du soi qui sont reconnus par des autoanticorps. Il s'agit avant tout de protéines nucléaires, cytoplasmiques ou extracellulaires qui sont soit structurales (le collagène) ou fonctionnelles (enzyme), ubiquitaire (d'où le caractère systémique de certaines MAI) ou spécifiques de certains organes.

Dans certains cas, ces auto-antigènes sont représentés par des acides nucléiques ou des phospholipides donnant ainsi avec les anticorps des complexes protéine/acide nucléique ou protéine/phospholipide.

Les autoantigènes reconnus par les AAN sont des antigènes ubiquitaires nucléocytoplasmiques (figure 2) représentés par des acides nucléiques, des nucléoprotéines et d'antigènes nucléaires solubles [63].

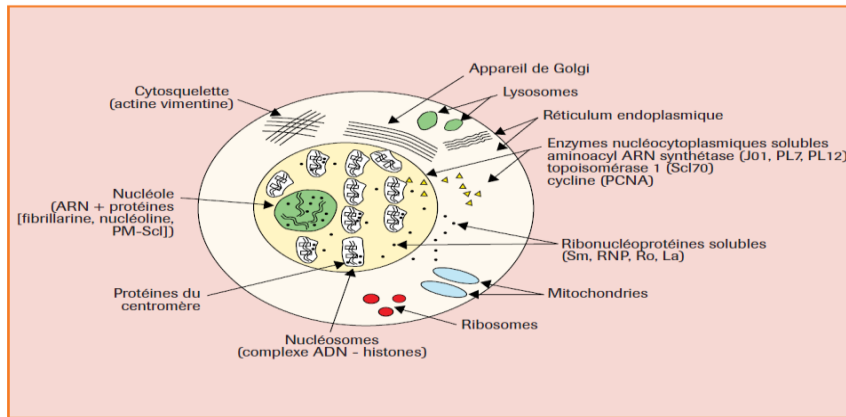


Figure3 : Les différents antigènes nucléocytoplasmiques [63].

Tableau 7 : tableau récapitulatif des auto-antigènes nucléaires avec leurs structures et fonctions biologiques. [5, 64].

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



2.3- Rôle des AAN dans la pathogenèse des MAI systémiques

Le fait que les auto-anticorps apparaissent chez certains patients atteints d'une MAI systémique avant le début des symptômes, laisse suggérer que cette rupture de tolérance est un événement fondateur dans la physiopathologie de ces maladies, mais n'est pas seulement secondaire à leur activité [65].

2.3.1-Production des AAN

L'interaction entre des facteurs déclenchant chez un sujet génétiquement prédisposé est à l'origine de l'apparition d'une réponse auto-immune pathogène impliquant l'émergence des lymphocytes auto-réactifs, l'accessibilité des auto-antigènes (corps apoptotiques) aux CPA, et leur présentation aux lymphocytes auto-réactifs aboutissant à la production des AAN [4].

2.3.2-AAN dans la genèse des lésions

La plupart des anticorps antinucléaires sont dépourvus de toute action pathogène directe, comme en témoignent la présence d'anticorps antinucléaires dans le sérum de sujets normaux et l'impossibilité de transférer passivement la maladie à des sujets volontaires ou à des animaux par le sérum lupique [5].

Cependant la participation de certains AAN dans la physiopathologie du LED est démontrée : les anticorps anti-ADNdb contribuent à l'atteinte rénale et cérébrale et les anticorps anti-SSA sont associés au bloc auriculoventriculaire foetal. C'est via leur capacité à se lier à des auto-antigènes circulants et à former des complexes immuns que ces anticorps vont devenir pathogènes dans la maladie lupique, en se déposant au niveau des tissus et des vaisseaux où ils vont induire des lésions [4]. Bien que l'implication des AAN dans la genèse de la maladie ne soit établie au cours de toutes les MAI systémiques, leur valeur diagnostique en tant que marqueurs sérologiques de toutes les MAI systémique est sans doute établie [66].

2.4- La valeur clinique des auto-anticorps anti-nucléaires

La présence des AAN parmi les critères de diagnostic et de classification, leur caractère prédictif et leur introduction comme élément du suivi thérapeutique en font de précieux outils pour la prise en charge des maladies auto-immunes. [67]



En pratique courante, le dosage d'un AAN a habituellement 4 intérêts différents :

- Diagnostic ;
- Pronostic ;
- Suivi évolutif de la maladie ;
- Prédiction de la réponse au traitement (plus récemment, quelques données préliminaires pourraient suggérer un rôle potentiel des auto-anticorps dans la prédiction de la réponse au traitement) [63].

- **La valeur diagnostique d'un auto-anticorps anti-nucléaire**

Les MAI systémiques peuvent se manifester par une symptomatologie très pauvre au début, ne touchant parfois qu'un organe ou très polymorphe ne permettant pas toujours d'orienter d'emblée le clinicien, d'où l'intérêt de la recherche des AAN qui ont un véritable rôle comme marqueurs diagnostiques. La prescription d'AAN adaptée aux signes clinico-biologiques est un élément clé du diagnostic des MAI systémiques [68].

- **La valeur pronostique des auto-anticorps anti-nucléaire**

En termes de pronostic, les AAN ont une place importante. En effet, alors que leur association à une pathologie est rarement spécifique, leur lien avec l'atteinte d'un ou plusieurs organes susceptibles, dans certains cas, d'engager le pronostic vital ou fonctionnel, semble plus étroit. Ainsi, la positivité de certains AAN peut être prédictive de l'apparition de manifestations cliniques potentiellement graves :

anti-JO1 et atteinte pulmonaire dans la polymyosite ; anti-ADN double brin et néphrite lupique; anti-CCP et érosions osseuses dans la PR... [63]

- **La valeur évolutive des auto-anticorps anti-nucléaire**

Au-delà de la valeur pronostique, certains auto-anticorps ont des titres qui fluctuent en fonction de l'activité de la connectivite. C'est notamment le cas des anti-ADN double brin dans le cadre du LED. Pour certains d'entre eux, l'ascension de leurs titres peut être annonciatrice d'une rechute de la maladie. La fluctuation des taux d'auto-anticorps doit toujours être confrontée à l'évolution clinique car l'interprétation de la fluctuation des taux d'auto-anticorps seule peut être difficile [63].



2.4.1- Valeur clinique des anticorps anti-antigènes nucléaires insolubles

➤ **Les anticorps anti-ADN natif (dsDNA)**

Les anti-ADN natif (double brin) ont une grande valeur diagnostique dans le lupus érythémateux disséminé (LED), retrouvés chez 90% des patients avec corrélation du titre avec l'évolutivité de la maladie [69]. Bien qu'ils n'en soient pas strictement spécifiques. Ils s'observent en effet, quoique rarement, au cours de la polyarthrite rhumatoïde, du syndrome de Sharp (connectivite mixte), du syndrome de Gougerot-Sjögren, du SAPL, des hépatopathies auto-immunes et médicamenteuses. 10 à 30 % des formes débutantes de LED n'ont pas d'anticorps anti-ds DNA détectables. Cette absence peut être transitoire, d'où la nécessité de renouveler leur recherche dans le temps [70].

➤ **Les anticorps anti histones**

Les cibles de ces anticorps sont les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4. Ils sont fréquemment retrouvés dans le LES, mais aussi dans d'autres MAI et au cours d'infections [69]. Ils ont un intérêt pour le diagnostic de lupus induit par les médicaments (notamment les formes induites par la quinidine ou la D-pénicillamine), avec un intérêt tout particulier accordé à la spécificité anti-complexe H2A/H2B. Cette réactivité n'est cependant pas spécifique du lupus induit [70].

➤ **Les anticorps anti nucléosomes**

Ils sont retrouvés chez 70 à 90 % des patients lupiques, le plus souvent associés aux Ac anti-ADN natif. Ils sont surtout utiles au diagnostic des LES sans anti-ADN natif. Par ailleurs, un titre élevé (par technique ELISA ou Dot) est évocateur d'une atteinte rénale [69].

2.4.2- Valeur clinique des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles

➤ **Les anticorps anti-snRNP**

Il s'agit d'anticorps dirigés contre Le U1 snRNP, retrouvés dans le syndrome de SHARP (100 % des patients), le LES (30 %), la PR (15 %), les sclérodermies, ils sont de bon pronostic lorsqu'ils sont isolés [69].

➤ **Les anticorps anti-Sm**

Ils sont fréquemment associés aux anticorps anti-U1snRNP [69].



Ils sont spécifiques du LES (10-20 %) et persistent pendant les rémissions [71, 72].

➤ **Les anticorps anti-Ro/SSA (Ro60)**

Ils sont très fortement associés au SGS (70 %) et au LES (30 %). Parfois, les AAN sont négatifs ; de fait, les Ac anti-SSA/Ro doivent être recherchés devant un contexte clinique particulier (SGS, LES, grossesse) [69]. Ils sont de mauvais pronostic lorsqu'ils sont isolés et ont une valeur diagnostique dans :

- Les LED sans anticorps anti-dsDNA ;
- Le lupus subaigu marqué par des lésions cutanées des zones photo exposées et une atteinte de la muqueuse buccale ;
- Le lupus néonatal et le bloc auriculo-ventriculaire congénital. [70]

➤ **Les anticorps anti-La/SSB**

Dirigés contre une protéine phosphorylée de 48 kD couplée à des ARN transcrits par l'ARN polymérase III. Ils s'observent dans 10 à 90 % des syndromes de Gougerot-Sjögren presque toujours associés aux anti-Ro/SSA ainsi que dans 5 à 20 % des LED et au cours du lupus néonatal [71].

➤ **Les anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen)**

Ils sont retrouvés dans le LES il est présent chez moins de 5 % des LES et caractérisent une atteinte rénale grave ou neurologique [69, 71].

➤ **Les anticorps anti-Scl70**

Ils sont détectés le plus souvent au cours des sclérodermies systémiques diffuses (20-60 % des cas) et sont de mauvais pronostic, associés à des complications pulmonaires [69].

2.4.3- Valeur clinique des anticorps anti-centromère

Les Ac anti-protéines centromériques, B, C sont retrouvés dans 60 à 80 % des sclérodermies à forme cutanée limitée (95 des syndromes CREST) et dans 8 % des sclérodermies systémiques diffuses, ainsi qu'au cours des cirrhoses biliaires primitives (CBP) et du SGS secondaire [69].

2.4.4- Valeur clinique des anticorps anti membrane nucléaire

Les anti-gp210 sont retrouvés dans la CBP, notamment séronégative pour les anti-M2 ; anti-lamines A, B, C (sans significativité clinique) [69, 71].

Tableau 8 : Anticorps marqueurs de MAI reconnus comme critères de classification /diagnostiques internationaux [68].

Anticorps	Critères de		Prévalence
Anti-Ro /SS-A Anti-La /SS-B	SGS	AECG 2002 [1], ACR 2012 [2]	30-70% 30-40%
Anti-ADN db	LES	ACR 1982 révisés 1997 [3] SLICC 2012 [4]	75-85% (ELISA)
Anti-Sm			< 5 %
APL			8-23 %
ANA à titres élevés			> 95 %
Anti-centromères	Sclérodermie systémique (SS)	ACR/EULAR 2013 [5]	8% (SS diffuse), 57-82 % (SS limitée)
Anti-Scl-70			20-75 %
Anti-ARN polymérase III			5-19 %
Anti-phospholipides	SAPL	Sydney 2006 [6]	fonction de la clinique
ANCA	Vascularites associées aux ANCA	CHCC 2012 [7]	Anti-MPO: 60 % MPA/GEPA, 25 % GPA Anti-PR3: 65 % GPA, 26/10 % MPA/GEPA
Facteurs rhumatoïdes	PR	ACR/EULAR 2010 [8]	50-60%
CCP/ACPA			50-60 %

2.5- Les Indications de la recherche des auto-anticorps antinucléaires

La recherche des AAN est indiquée :

- En cas de suspicion de MAI systémique (un lupus érythémateux systémique, un syndrome de Sjögren, une sclérodermie, une connectivite mixte...) ou hépatite auto-immune ;
- Au cours du suivi de certaines MAI (LES) ;
- Dans d'autres situations cliniques : lupus néonatal lié au passage transplacentaire d'Ac anti- Ro/SS-A maternels (Bloc auriculo-ventriculaire, Signes cutanés, hépatite, Cytopénie) [68].

Leur recherche est habituellement faite en deux temps : après mise en évidence des anticorps antinucléaires totaux, les spécificités sont caractérisées [71].



CHAPITRE II :
EXPLORATION IMMUNOLOGIQUE
DES CONNECTIVITES



La présence d'auto-anticorps est une caractéristique des maladies auto-immunes, et leur analyse est un élément essentiel dans le diagnostic des maladies systémiques auto-immunes (MAI). En raison de l'apparition de profils d'auto AC chez les malades et de la complexité du diagnostic sérologique correspondant, différentes stratégies de diagnostic ont été suggérées pour les tests d'auto-Ac appropriés. [73]

L'analyse des anticorps antinucléaires (AAN) commence par une étape de dépistage qui est une première orientation dans la démarche de diagnostic, en cas de positivité il se poursuit par une étape de dosage des anticorps anti-ADN natifs (des excellents marqueurs diagnostiques et de suivi du lupus érythémateux systémique) et d'identification des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles avec précision et exactitude. [74]



Figure 4 : la démarche de la recherche des AAN.



1- Techniques utilisées pour le dépistage des Anticorps Anti-Nucléaires

Il existe principalement deux techniques : IFI sur cellules Hep-2 (méthode de choix considérée comme le gold standard dans les dernières recommandations de l'American College of Rheumatology (ACR) [75] et la technique ELISA utilisée par de nombreux laboratoires hospitaliers et privés [76].

1.1- La technique Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte se fait sur des cultures cellulaires notamment des cellules HEp2 (Human Epithelial cell line type 2), dérivées d'une Lignée tumorale (carcinome laryngé). Ces cellules offrent l'avantage de présenter de multiples mitoses [77], de gros noyaux et de gros nucléoles permettant une bonne visualisation des structures nucléaires reconnues par les anticorps du patient. [75] et donc une amélioration de ses performances au cours de ses dernières années [76].

1.1.1- Principe

L'IFI est une technique d'immunofluorescence, elle s'effectue en deux temps [78] : incubation des dilutions croissantes du sérum des patients dans des lames sur lesquelles ont été fixées les cellules HEp-2. Les autoanticorps fixés sur ces cellules sont ensuite révélés grâce à un conjugué anti-Ig humaine couplé à un fluorochrome (souvent l'isothiocyanate de fluorescéine ou FITC [78]). La lecture des lames et leur interprétation se font à l'aide d'un microscope à fluorescence. En cas de résultat positif, le titre des AAN (1/80, 1/160...) correspond à la dilution du sérum à laquelle la fluorescence disparaît. La fluorescence observée peut avoir différents aspects [75].

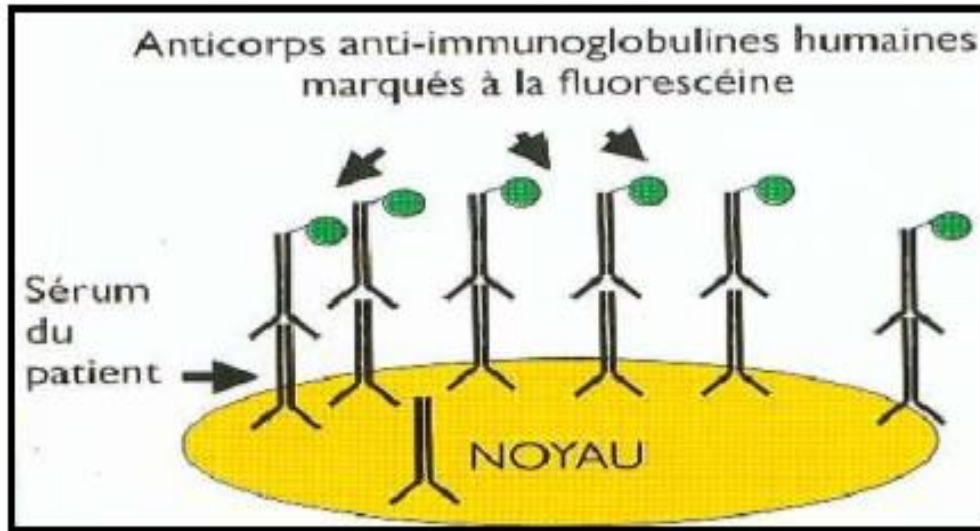


Figure5 : principe de la technique d'immunofluorescence indirect [79].

1.1.2- Interprétations des résultats

L'interprétation des résultats doit tenir compte non seulement des données microscopiques mais également du titre des autoanticorps et du contexte clinique et/ou biologique qui a nécessité la prescription d'une recherche d'autoanticorps [78].

Officiellement, un titre $> 1/80^e$ suffit pour considérer que le résultat est positif, mais en pratique, un titre $> 1/160^e$ paraît plus réaliste [80].

Pour les données cliniques et les examens complémentaires, ils ont une place importante dans l'interprétation et ce n'est que de la confrontation clinico-biologique que va résulter un diagnostic, voire un pronostic ou une décision thérapeutique [78].

La lecture au microscope à fluorescence constitue l'étape ultime de la technique IFI. La caractérisation de ces autoanticorps est basée sur l'aspect de la fluorescence ou *pattern* (nature, localisation et l'intensité de la fluorescence). Elle nécessite une parfaite connaissance de la structure histologique et/ou cytologique du substrat utilisé [78]. Les différents types de fluorescence qu'on peut observer sont : de type homogène, mouchetée, nucléolaire, centromérique... Chacun de ces aspects peut être présent de manière isolée ou associée aux autres aspects, ce qui rend l'interprétation très délicate [77].

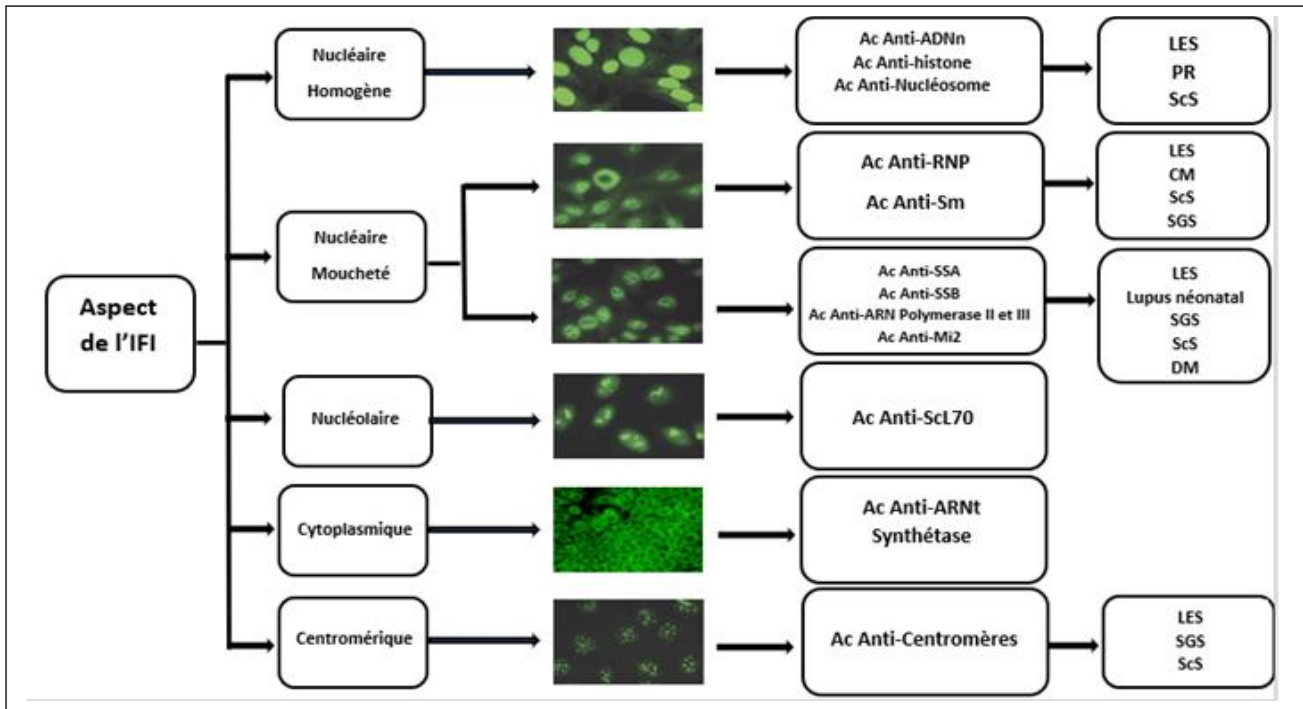


Figure 6 : schéma globale sur les aspects de la fluorescence, les autoanticorps et les maladies associées à chaque type de fluorescence [81].

1.1.3- Les avantages et inconvénients

Tableau 9 : Avantages et inconvénients de La technique Immunofluorescence indirecte [78].

Avantages	Inconvénients
Facilité d'exécution : deux incubations de 30 min entrecoupées de lavage, ne nécessitant que des dilutions de sérum à tester.	Le caractère non automatisable pour la totalité de la méthode avec le nécessaire contrôle de qualité de chaque étape.
Sensibilité : IFI est environs 100 fois plus sensible que l'immunoprécipitation.	L'expertise de lecture indispensable à une interprétation pertinente des résultats.
La reproductibilité des résultats.	La subjectivité dans l'interprétation des résultats, hautement dépendante de l'expérience de l'opérateur.
Possibilité de détecter plusieurs anticorps au même temps.	Un aspect peut en masquer un autre.
Maintien de l'antigène dans sa conformation native.	Investissement dans un microscope à fluorescence avec des objectifs de qualité (cout élevé).
Une quasi-assurance de détecter les auto-anticorps dirigés contre tous les types d'épitopes, séquentiels et conformationnels	



1.2- La technique ELISA

1.2.1- Principe

L'ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay), également appelée EIA (enzyme immunoassay) est une technique de détection immuno-enzymatique [77] permet la caractérisation de La plupart des AAc [82]. Elles sont désormais largement utilisées en raison de leur sensibilité (souvent supérieures à celle des autres techniques) [60].

L'ELISA appliquée à la recherche des AAN comporte quatre étapes principales :

- **Fixation de l'antigène** : Des antigènes extraits de cellules HEp-2 séparément puis hautement purifiés par affinité sont fixés sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène dans des conditions qui préservent leur état natif [83] ;
- **Fixation de l'anticorps à doser** : après incubation de sérum et les standards, les Ac à doser réagissent spécifiquement avec l'Ag immobilisé [82] ;
- **Fixation de conjuguée** : la détection des complexes antigène-anticorps se fait à l'aide d'un conjugué anti-IgG humaine couplé à une enzyme [60] ;
- **Révélation** : après l'ajout d'un substrat chromogène spécifique à l'enzyme, sa coloration reflète l'activité enzymatique résiduelle et donc la quantité mais aussi l'affinité des Ac à doser [82]. Une étape de mesure de l'intensité de la coloration développée fait à l'aide d'un spectrophotomètre [83]. Elle est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

1.2.2- Interprétation des résultats

ELISA utilisée lors du dépistage est une technique qualitative ou semi-quantitative. Donc on compare la densité optique de l'échantillon à un seuil de positivité proposé par le fournisseur du réactif, valeur de référence décisive qui conditionne la suite de la démarche immunologique (Rendre le résultat négatif ou réaliser l'identification des cibles antigéniques). Cependant, une valeur de référence peut varier d'une population à une autre [83].

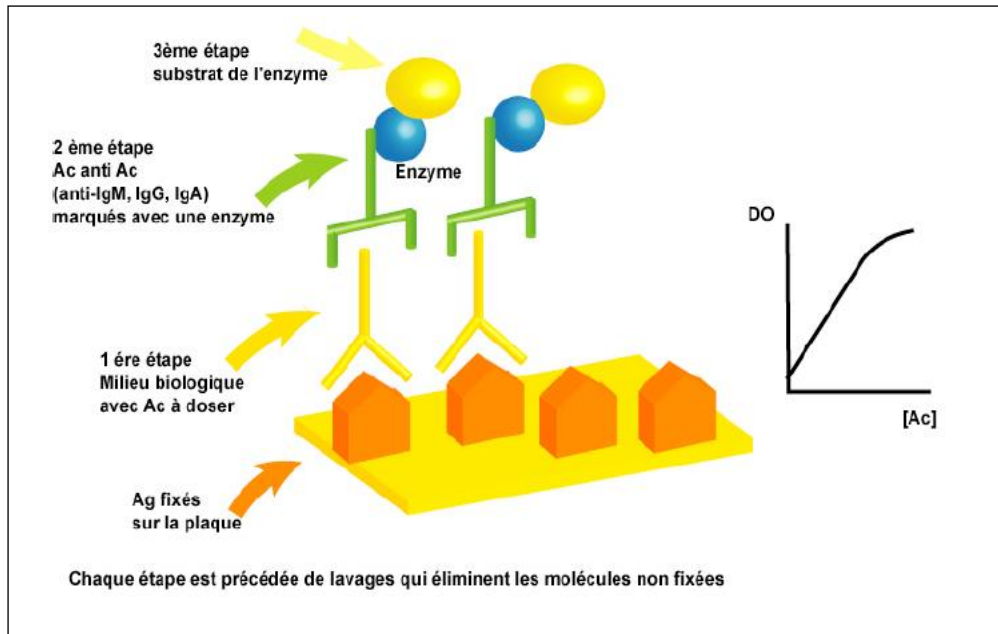


Figure 7 : principe du test ELISA indirect [82].

1.2.3- Avantages et inconvénients

Tableau 10 : Avantages et inconvénients de La technique ELISA [82, 60, 84].

Avantages	Inconvénients
Une technique simple et très sensible avec une spécificité élevée.	Possibilité d'avoir des résultats faussement positifs (La fixation non spécifique de protéines plasmatiques sur le support peut être due à une mauvaise saturation des sites libres du support. Certains constituants, agrégats d'IgG, Ig monoclonales, facteurs rhumatoïdes, peuvent fausser les résultats.)
Technique automatisée permet la réalisation rapide de grandes séries d'analyses donc économie de temps	Elles ne sont généralement pas standardisées d'où une grande divergence des résultats avec les différents kits commerciaux disponibles.
Une reproductibilité souvent meilleure qu'une technique manuelle et accessible à tous les biologistes.	La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement.
Une gestion informatisée des résultats (absence de subjectivité)	Influencée par la nature et la qualité de l'antigène.
Quantifier les AC avec précision	L'efficacité de l'adsorption de l'Ag sur le support solide.



2- Techniques utilisées pour le dosage des Anticorps Anti-ADN

Les trois méthodes les plus couramment utilisées sont [85]:

- L'immunofluorescence indirecte (IFI) sur *Crithidia luciliae* ;
- La radio-immunologie (test de Farr) ;
- Les dosages immuno- enzymatiques (ELISA).

2.1- L'immunofluorescence indirecte sur *Crithidia luciliae*

Crithidia luciliae est un protozoaire flagellé voisin du trypanosome. Ce parasite a la particularité de contenir une volumineuse mitochondrie (kinétoplaste) riche en ADN. Il s'agit d'un ADN natif circulaire, associé à des histones. Le kinétoplaste est excentré au niveau du corps cellulaire, il doit être différencié du noyau du parasite qui est plus volumineux, et du corps basal situé à la base du flagelle (figure 1).

2.1.1- Principe

La recherche d'anticorps anti-ADN par IFI est réalisée à partir d'un substrat constitué d'un étalement de *Crithidia luciliae* fixés. Le sérum est mis en contact avec ce substrat. Les anticorps anti-ADN fixés au niveau de l'ADN du kinétoplaste sont ensuite révélés par un conjugué anti-Ig humaines marqué à la fluorescéine [86]. La lecture se fait au microscope à fluorescence. Ce test met en évidence des anticorps anti-ADN natif.

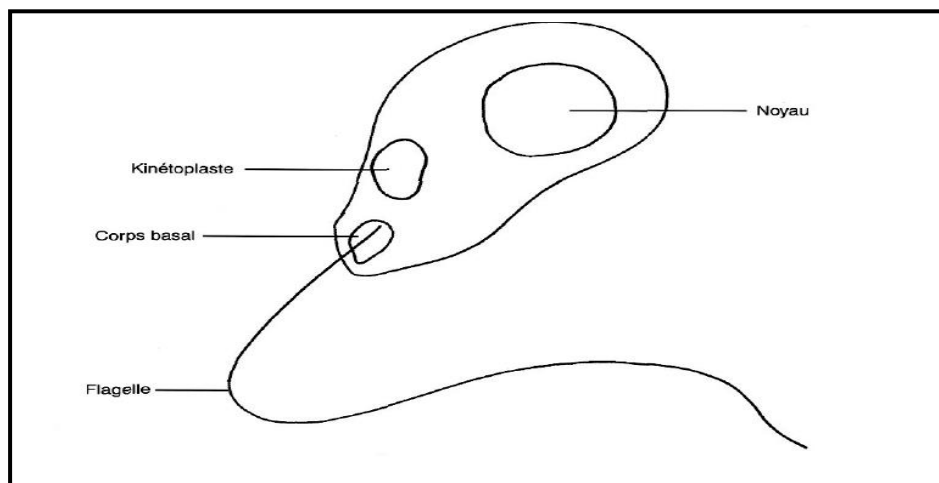


Figure 8 : *Crithidia luciliae* [61].

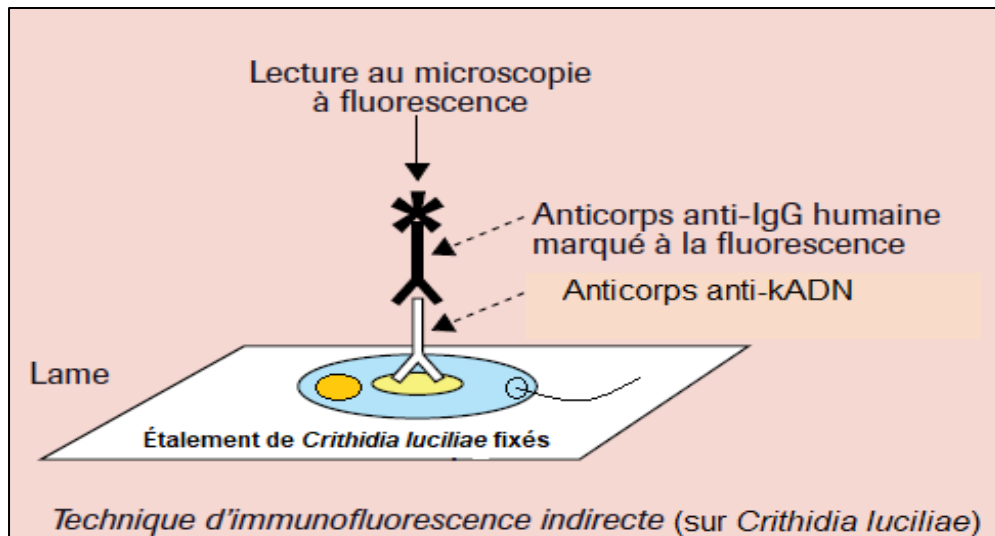


Figure 9 : techniques IFI sur *Crithidia luciliae* [60].

2.1.2- Interprétation des résultats

C'est une technique semi-quantitative (titrage) qui met en évidence des Ac ADNdb (natif) dont sa lecture est difficile et subjective ;

- Un résultat négatif pour la recherche d'anticorps anti-ADN natif se caractérise par une absence de marquage du kinétoplaste.
- Un résultat positif se caractérise par une fluorescence nette du kinétoplaste.
- Une fluorescence du noyau et/ou du corps basal, sans fluorescence du kinétoplaste, est un résultat négatif quant à la recherche d'anticorps anti-ADN natif [61].

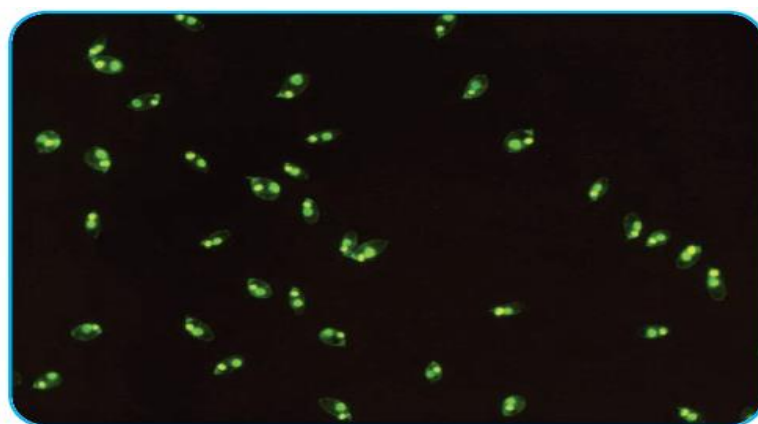


Figure 10 : Anticorps anti-ADN positifs sur *Crithidia luciliae* [87].

2.2- Test de Farr

Elle reste la technique de référence, mais son principal écueil est lié aux contraintes d'utilisation des radioéléments [87].

2.2.1- Principe

Ce test consiste à incuber de l'ADN radiomarqué avec le sérum du patient. Les complexes ADN anti-ADN sont ensuite précipités par le sulfate d'ammonium ou le polyéthylène glycol. L'ADN non lié reste en solution. La radioactivité présente dans le précipité est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-ADN natif présents dans le sérum [88].

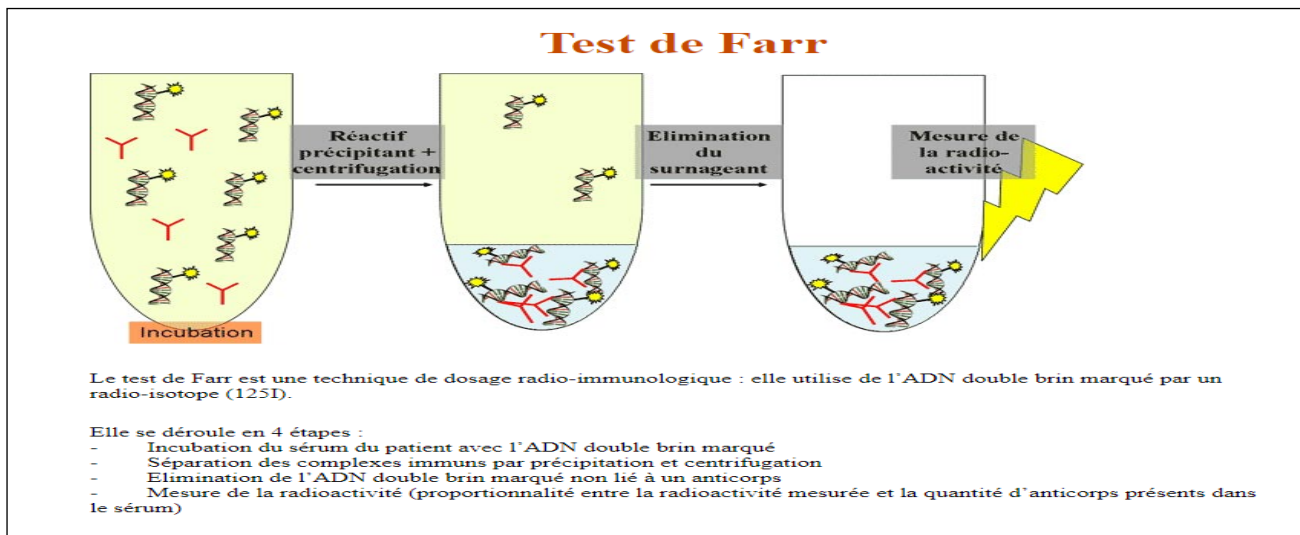


Figure 11 : Technique radio-immunologique (Test de Farr) [89].

2.2.2- Interprétation des résultats

Ce test est quantitatif, les résultats sont exprimés en unités internationales (UI/ml). Un résultat positif est hautement spécifique du LED. Il implique des conditions techniques très rigoureuses en raison, notamment, du risque de dénaturation de l'ADN [61].

Le test de Farr n'est pas si insensible que l'on a pu le dire aux IgM et donne de faux positifs chez des patients sous biothérapie (anti-TNF α) [87].

2.2.3- Avantages et inconvénients

Tableau 11 : Avantages et inconvénients de la technique Radio immunologique (Farr) [90].

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

2.3- Technique ELISA

2.3.1- Principe

Les anticorps anti-ADN natif du sérum à étudier se lient à de l'ADN natif fixé au fond des puits d'une plaque de microtitration. La fixation d'anticorps anti-ADN natif est détectée par addition d'anticorps anti-Ig humaines marqués par une enzyme. Le substrat de l'enzyme (initialement incolore) devient coloré après action de l'enzyme. La lecture des densités optiques est faite à la longueur d'onde correspondant au substrat utilisé [91, 92].

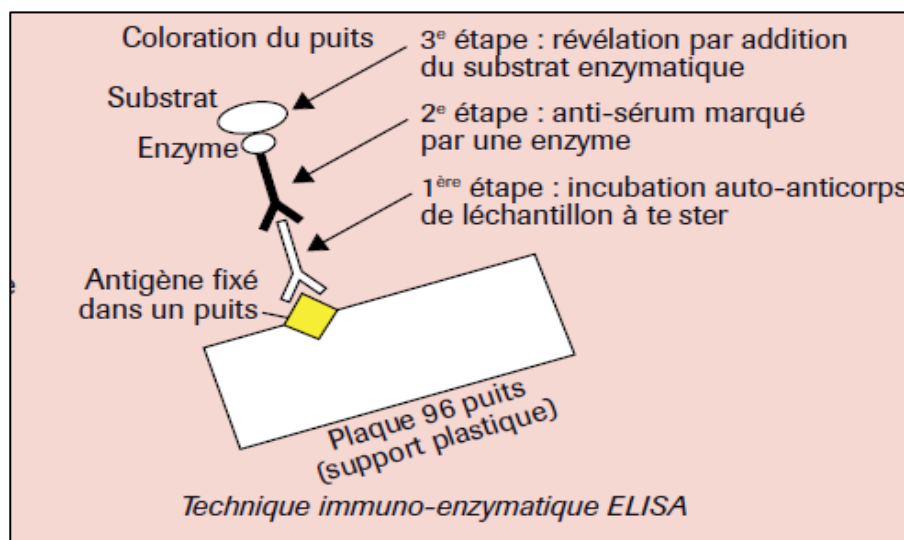


Figure 12 : Technique immuno-enzymatique ELISA [60].



2.3.2- Interprétation des résultats

Les résultats sont exprimés en unités dont le mode de calcul dépend de la trousse utilisée. Le plus souvent, une courbe d'étalonnage est construite à partir de différentes dilutions d'un standard connu et titré en unités internationales (UI).

Le seuil de positivité doit être déterminé pour chaque technique. Il est établi à partir de la moyenne des résultats obtenus avec des sérums normaux (au minimum 100 à 200, représentatifs des différentes tranches d'âges de 20 à 60 ans et des deux sexes) additionnée de deux déviations standard.

3- Techniques utilisées pour l'identification des Anticorps dirigés contre les Ag nucléaires-Solubles

3.1- Technique ELISA

3.1.1- Principe

Les anticorps anti-ENA du sérum à étudier se lient aux antigènes solubles purifiés ou recombinants fixé au fond des puits d'une plaque de microtitration (chaque puits possède un seul Ag fixé).

La fixation d'anticorps anti-ENA est détectée par addition d'anticorps anti-Ig humaines marqué par une enzyme. Le substrat de l'enzyme (initialement incolore) devient coloré après action de l'enzyme. La lecture des densités optiques est faite à la longueur d'onde correspondant au substrat utilisé [61].

3.1.2- Interprétation des résultats

Les résultats sont qualitatifs et exprimés par rapport à la densité optique lue pour des témoins connus positifs ou négatif [61].

3.2- Immunodot

3.2.1- Principe

Le dépôt des antigènes sous forme d'une petite tache ronde (dot-spot) ou en ligne fine (dot-line) sur un support en nylon ou du dérivé cellulosique pour assurer une bonne capacité d'adsorption et une meilleure affinité pour les antigènes nucléaires solubles, ceci réduit le

risque de dénaturation de ces antigènes. Plusieurs antigènes différents peuvent être déposés sur la même membrane, permettant la détection simultanée de nombreux anticorps anti antigènes nucléaires solubles différents. Une fois séchée, la membrane est saturée par des agents bloquants et stabilisants puis conservée à l'abri de l'humidité. Ces antigènes nucléaires alors situés à la surface de la membrane peuvent se complexer avec leurs anticorps spécifiques par incubation avec le sérum. Les anticorps capturés sont localisés par immuno-détection, à l'aide d'un antisérum marqué par une enzyme, et révélés par le substrat correspondant [90].

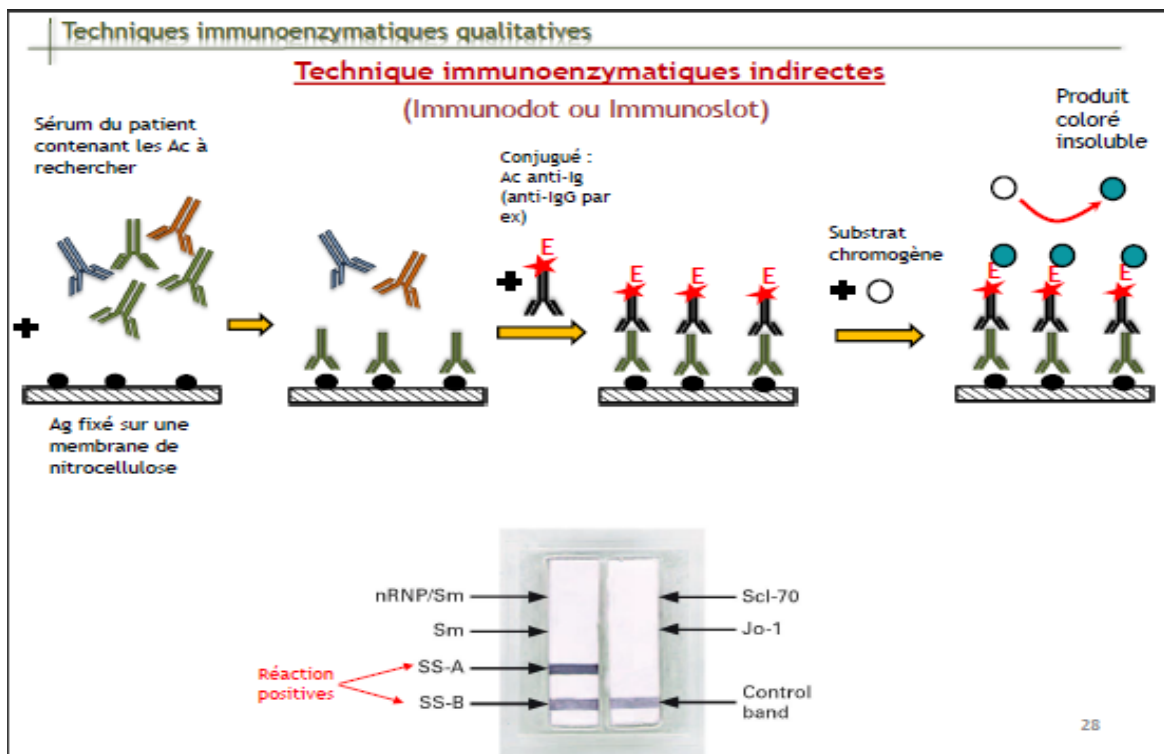


Figure 13 : principe Immunodot [93].

3.2.2- Interprétation des résultats

La lecture des résultats par simple appréciation visuelle de la coloration fournit des résultats qualitatifs, à la limite semi-quantitatifs si l'on tient compte de l'intensité de la coloration [90].



3.2.3- Avantages et Inconvénients

Tableau 12 : Avantages et inconvénients de La technique Immunodot [93].

Avantages	Inconvénients
Analyse de complexes protéiques, de plusieurs protéines simultanément, des modifications post-traductionnelles des protéines.	Risque de réactivité non spécifique des anticorps secondaires en technique de révélation indirecte.
Large application analytique dépendant du vaste choix d'anticorps spécifiques.	Lecture délicate.
Mesure quantitative possible.	

3.3- Immunoblot

3.3.1- Principe

L'Immuno-transfert, ou western blot, est une technique pour l'analyse et l'identification des antigènes des protéines. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis transférées électrophorétiquement sur une membrane (de nitrocellulose, par exemple). Les bandes des protéines pour lesquelles on recherche les antigènes sont détectés par dépôt d'un Ac spécifique, suivi d'un second Ac marqué par un isotope, un fluorochrome ou une enzyme [94].

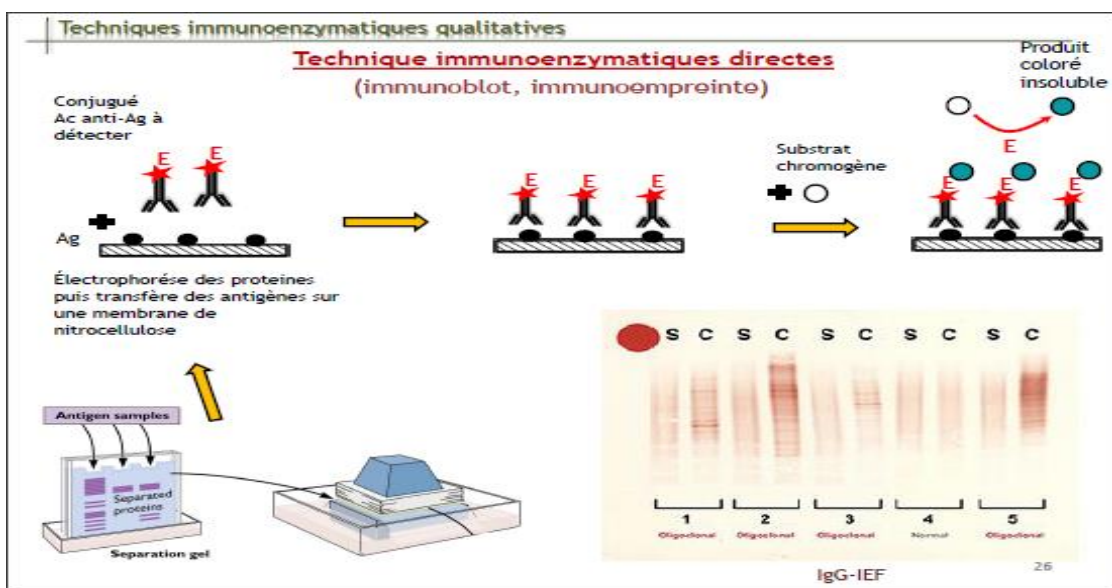


Figure 14 : principe de la technique Immunoblot [93].

3.3.2- Interprétation des résultats

Une lecture qualitative ou semi-quantitative (densitomètre) de l'intensité des colorations peut être réalisée, cette étape consiste à détecter les anticorps fixés et ce, grâce à des anticorps anti-immunoglobulines humaines généralement conjugués à la peroxydase. Après lavages l'activité enzymatique est mise en évidence par l'addition du substrat. La réaction est arrêtée par lavage à l'eau distillée [95].

3.3.3- Avantages et inconvénients

Tableau 13 : Avantages et inconvénients de La technique Immunoblot [95].

Avantages	Inconvénients
La technique d'immuno-transfert permet de détecter des autoanticorps non détectés par les techniques immuno-enzymatiques de type ELISA.	Les protéines sont dénaturées par le SDS et, ainsi, seuls les épitopes « linéaires » persistent ; la technique ne permet pas de détecter des autoanticorps dirigés contre des épitopes conformationnels.
Elle permet d'identifier avec précision le PM et, donc, la nature de l'antigène cible reconnu par les autoanticorps.	L'interprétation peut être difficile lorsque les préparations antigéniques sont contaminées par d'autres protéines.
Elle permet de réaliser une identification de plusieurs antigènes présents dans un échantillon contenant plusieurs protéines (exemples des protéines ribosomiques, mitochondriales, des histones et des protéines du réticulum endoplasmique).	Cette technique est d'une durée beaucoup longue par rapport aux techniques immuno-enzymatiques de type ELISA.
	Un sérum témoin connu positif doit être utilisé dans chaque réaction.

3.4- Immunodiffusion double d'Ouchterlony

3.4.1- Principe

Dans cette technique, la diffusion de l'antigène et de l'anticorps se fait l'un vers l'autre à partir de réservoirs creusés dans une gélose. Généralement, le puit central contient l'extrait antigénique, les sérums à tester étant disposés à la périphérie [95].

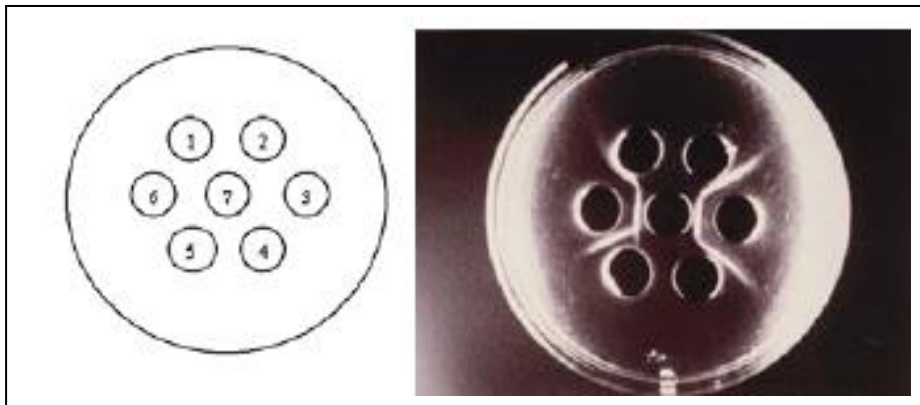


Figure 15 : principe de la technique Ouchterlony [90].

3.4.2- Interprétation des résultats

Pour un couple antigène nucléaire soluble –anticorps anti-ENA donné, l'emplacement de l'arc de précipitation dans le gel est fonction des coefficients de diffusion des réactants, L'apparition de plusieurs lignes de précipitation indique la présence d'un nombre au moins égal de couples antigène-anticorps. Elle permet en outre d'identifier les anticorps anti-ENA en comparant leurs réactivités vis-à-vis de celles obtenues avec des sérums étalons monospécifiques dits « sérums de référence ». Ainsi, en comparant les arcs formés par les deux systèmes antigène-anticorps, il est possible de déduire leur parenté [95].

3.4.3- Avantages et inconvénients

Tableau 14 : Avantages et inconvénients de La technique Ouchterlony [95].

Avantages	Inconvénients
Utilisée du fait de sa facilité de mise en œuvre.	Manque de sensibilité. Technique très lente.
Faible coût.	Lecture délicate si deux arcs se superposent.

3.5- L'électro-synérèse

3.5.1- Principe

Dans cette technique essentiellement qualitative, les antigènes et anticorps sont déposés dans des réservoirs creusés dans une plaque de gélose où ils migrent à la rencontre l'un de l'autre sous l'influence d'un champ électrique [95].

3.5.2- Interprétation des résultats

La lecture reprend les principes énoncés pour l'immunodiffusion : le nombre de systèmes antigène-anticorps est au moins égal à celui du nombre d'arcs de précipitation. Une réaction d'identité vis-à-vis d'un sérum monospécifique de référence est recherchée [95].

3.5.3- Avantages et inconvénients

Tableau 15 : Avantages et inconvénients de L'électrosynérèse [95].

Avantages	Inconvénients
Elle serait plus sensible que l'Immunodiffusion double d'Ouchterlony.	Difficultés techniques dans sa réalisation : choix du pH, appareillage adapté...

3.6- Technologie Luminex

3.6.1- Principe

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

-le laser rouge à diode (633 nm), qui excite les fluorochromes incorporés aux billes de polystyrène vont réémettre une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm).

Chaque bille réémet d'une façon différente et sera identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge enregistrées par un capteur à la sortie du flux [96, 97].

-le laser vert, excite le fluorochrome qui est conjugué à une molécule reporter (Anti-Ig) permet de détecter l'interaction antigène nucléaire soluble –anticorps anti ENA à la surface de la bille en émettant une fluorescence verte (575 nm) qui détermine la positivité de la réaction en fonction d'un seuil de fluorescence propre à chaque bille [79].

Les billes sont détectées et comptées jusqu'à ce que chacune d'entre elles ait été détectée au moins 100 fois, soit au moins 10 000 événements comptés (100 × 100). Pendant cette lecture, on peut suivre en temps réel cette acquisition, par la progression du pic d'acquisition des données [95].

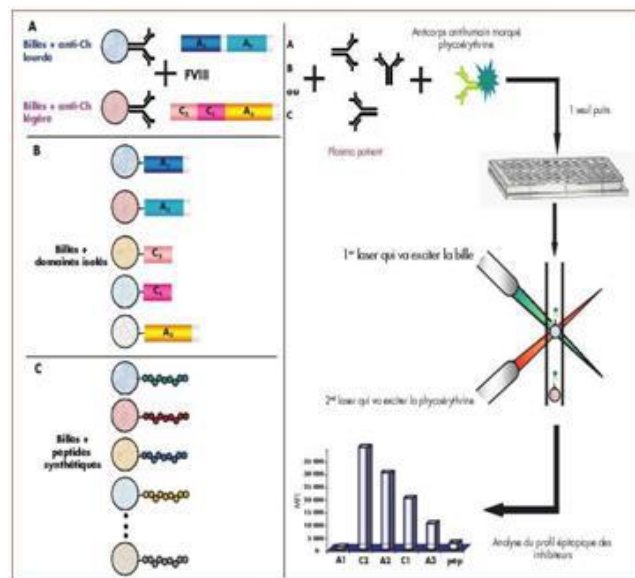


Figure 16 : principe de la Technologie Luminex [97].

3.6.2- Interprétation des résultats

Le logiciel d'analyse permet d'obtenir un pourcentage de réactivité (PRA) sur le panel de microsphères (une identification des spécificités des anticorps par étude des réactions positives et des réactions négatives).

Les données brutes de fluorescence (raw data) sont normalisées par rapport au seuil (cut off) propre à chaque catégorie de microsphères et ensuite traduites en intensité de réaction (scores de 1 à 8). Le pourcentage de réactivité (PRA) correspond au pourcentage des catégories de microsphères les plus positives. Pour affiner l'interprétation et la définition des anticorps



surtout quand les patients sont très immunisés, il est possible d'analyser les données brutes de fluorescence, ce qui permet, parmi les réactions positives, de dégager seulement les plus positives [98].

3.6.3- Avantages et inconvénients

Tableau 16 : Avantages et inconvénients de La technique Technologie Luminex [95].

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



CHAPITRE III :
EVALUATION D'UNE
TECHNIQUE D'ANALYSE



L'exploration biologique de maladies nécessite un ensemble de techniques fiables validées. La fiabilité d'une technique est jugée en fonction des résultats obtenus, ces derniers permettent de poser le diagnostic. L'obtention d'un diagnostic exact est primordiale pour orienter la prise en charge.

Face à un intérêt grandissant pour ces techniques biologiques et la nécessité d'approfondir leur caractérisation, une évaluation rigoureuse doit donc être faite.

Une évaluation est une mesure à l'aide d'un ensemble de paramètres des performances, on entend par performances des critères qui permettent le choix d'une méthode ou technique par rapport à une autre, des critères qui nous poussent à innover et à développer d'autres méthodes ou techniques (plus efficaces) [99].

Les paramètres d'évaluation sont plusieurs, on peut citer [100] :

- Evaluation de la sensibilité ;
- Evaluation de la spécificité ;
- Evaluation du domaine d'analyse (Elle permet de définir les limites haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyse observée et la dilution effectuée) ;
- Evaluation de la limite de détection (est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée d'un blanc de la réaction) ;
- Evaluation de la répétabilité ;
- Evaluation de la reproductibilité ;
- Evaluation de la justesse (Elle permet de mettre en évidence les erreurs systématiques dépendantes ou non de la concentration de l'analyte à doser) ;
- Evaluation des interférences.



1- Indicateurs de performance d'un test diagnostique

Définir la validité d'un test, c'est donc mesurer la capacité du test à séparer les sujets malades et non malades chez lesquels le diagnostic aura été établi auparavant avec certitude par un test de référence [101].

Les qualités des tests ou validités sont de deux types [102] d'une part celles qui relèvent exclusivement du test lui-même, ce sont la sensibilité et la spécificité [103] regroupée sous le nom des mesures expérimentales de performances d'un test (dites aussi mesures de validités intrinsèques) [104], et d'autre part celles qui sont relatives à l'utilisation du test pour une population donnée [103] dites aussi les mesures des performances d'un test en situations réelles ou validité extrinsèque [104].

1.1- La validité intrinsèque

La validité intrinsèque du test est la capacité informative du test, c'est-à-dire la capacité du test à catégoriser les patients. [4] En d'autres termes L'aptitude d'un test à reconnaître les malades et les non malades [104].

Ces mesures tendent à répondre à la question suivante : « Le test réagit-il correctement à la présence ou à l'absence de ce à quoi il est destiné à mettre en évidence (une maladie, une mesure correcte d'un paramètre biologique, etc.) ? » [104]. Cette information s'intégrant dans la démarche diagnostique afin d'améliorer, d'infirmer ou de confirmer une suspicion clinique ou, dans le cas des tests de dépistage, de repérer dans une population générale les sujets porteurs d'une affection donnée [105].

Nous avons deux types de mesures intrinsèques : la sensibilité et la spécificité.

1.1.1- Définitions

➤ La sensibilité

Deux types de sensibilité sont généralement définis : la sensibilité analytique et la sensibilité diagnostique. La différence entre ces deux sensibilités repose sur l'origine du support utilisé. Pour la sensibilité analytique, les supports sont des supports de référence et pour la sensibilité diagnostique, les supports sont issus du terrain. Dans tous les cas, la sensibilité vise à évaluer



la capacité de la méthode soumise à validation à donner une réponse positive quand la cible est présente [106].

La sensibilité analytique d'une épreuve désigne la quantité minimale d'analyte pouvant être décelée [107].

La sensibilité diagnostic définie par la proportion (%) de patients qui ont la maladie recherchée et dont le test est positif (vrai positifs) [10], en d'autres termes C'est la probabilité du résultat positif du test (T+) chez les sujets porteurs de la maladie (M+) [102].

➤ La spécificité

Comme pour la sensibilité, Deux types de spécificités sont également définis : la spécificité analytique et la spécificité diagnostique. Dans tous les cas, la spécificité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à ne pas donner de réponse quand la cible n'est pas présente [106].

La spécificité analytique désigne l'aptitude de l'épreuve à ne pas présenter de réaction croisée avec d'autres analytes [107]. Donc elle garantit que le résultat de l'analyse ne provient que de l'analyte [108].

La spécificité diagnostic définie par la proportion (%) de patients qui n'ont pas la maladie recherchée et dont le test est négatif, (vrai négatifs) [109]. En d'autres termes c'est la probabilité que le test soit négatif chez les sujets réellement négatifs [110]. Donc La spécificité représente la capacité d'un test à ne pas alerter faussement les non malades [104].

1.1.2- Calcul de sensibilité et spécificité

La méthode de calcul de sensibilité et spécificité diffère selon la nature du test (qualitatif ; quantitatif ou semi-quantitatif).

Une méthode semi-quantitative est une méthode qui fournit un résultat qualitatif extrapolé à partir de la mesure d'une donnée quantifiable (c'est le cas de notre techniques immuno-enzymatique avec lecture d'une densité optique [D.O.]) [111] et donc on revient à une réponse qualitative de type binaire (positif/négatif, présent/absent). En effet, même dans le cas où le résultat brut d'un test n'est pas binaire mais quantitatif ou qualitatif ordinal, le choix d'une valeur seuil est souvent effectué pour distinguer deux résultats opposés [110].



La sensibilité et la spécificité sont fixes et les résultats du test obtenus dans une population de sujets dont l'état « malade » versus « non malades » est caractérisé sans ambiguïté par un autre examen (si possible un « Gold Standard »), vont être représentés dans un tableau, dit « tableau de contingence » [105] ou « 2×2 » représentant les effectifs pour chaque catégorie [110].

Tableau 17 : tableau de contingence 2×2 . [110]

		Maladie (test de référence)	
		Oui	Non
Test à évaluer	Positif	a = VP	b = FP
	Négatif	c = FN	d = VN

- VP (vrais positifs) : sujets effectivement malades pour lesquels le test est positif. Donc diagnostic posé avec succès.
- VN (vrais négatifs) : sujets effectivement non malades pour lesquels le test est négatif. Donc diagnostic écarté avec succès
- FP (faux positifs) : sujets en réalité non malades pour lesquels le test est positif. Donc une fausse alerte
- FN (faux négatifs) : sujets en réalité malades pour lesquels le test est négatif. Diagnostic manqué [101, 104].

$$Se = P(T^+/M^+) = \frac{a}{a+c} = \frac{VP}{VP+FN} \quad Spe = P(T^-/M^-) = \frac{b}{b+d} = \frac{VN}{VN+FP}$$

Remarque : On appelle gold standard le meilleur test diagnostique déjà disponible pour la pathologie d'intérêt et utilisable en situation « raisonnable », c'est-à-dire applicable chez des patients en clinique ou en recherche. Ce terme a déjà été soumis à controverses dans la mesure où l'on pourrait croire qu'il est équivalent à « la réalité », alors qu'il ne s'agit que d'un point de référence correspondant aux connaissances dans leur état actuel [110], donc il peut s'accompagner d'un certain taux d'erreur [101] (faux-négatifs et faux-positifs) quand il est comparé à une réalité de qualité supérieure (autopsie, pièces pathologiques) [112].



1.1.3- Interprétation des résultats

La Sensibilité et la spécificité sont des proportions : elles ne peuvent donc varier qu'entre 0 et 1 (0 et 100%). Elles s'expriment en pourcentage [101].

Plus le test est sensible, moins il comportera de faux négatifs, et mieux il permettra s'il est négatif, d'exclure la maladie. La sensibilité permet donc de nous dire si le test est suffisamment bon pour identifier les personnes malades [113].

Plus le test est spécifique, moins il occasionnera de faux positifs et mieux il permettra s'il est positif de confirmer la maladie [109]. La spécificité permet donc d'indiquer si le test est suffisamment bon pour identifier les personnes non malades [113].

La sensibilité et la spécificité sont fixées pour une maladie donnée et sont indépendantes de sa prévalence [102], comme elles sont indépendantes du type de patient testé. Le fait que la sensibilité et la spécificité ne soient pas égales à 100 % traduit les imperfections techniques du test, et n'a rien à voir avec le malade [103].

Remarque : généralement, plus un test est sensible, moins il est spécifique et plus il est spécifique, moins il sera sensible. Il n'existe pas de test diagnostique ayant des valeurs de 100 % [104].

- **Limite de la sensibilité et spécificité**

Ces 2 caractéristiques sont intrinsèques au test et ne se rapportent pas à la population. Elles ne permettent donc pas de répondre à une question d'importance pour le médecin et le patient : quelle est la probabilité d'être malade en présence d'un test positif (ou quelle est la probabilité de ne pas être malade en présence d'un test négatif).

Pour cela, deux autres notions doivent être présentées afin de poser un diagnostic correct, c'est les valeurs prédictives [113].



1.2- Validité extrinsèque ou Valeurs prédictives d'un test

Les valeurs prédictives reflètent la performance d'un test en situation réelle, sont aussi appelées probabilités a posteriori ou probabilités post-test. On distingue deux valeurs : la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative.

1.2.1- Définitions

➤ La valeur prédictive positive (VPP)

La VPP est la probabilité que la personne soit réellement malade si son test est positif. C'est le nombre de vrais positifs (tests positifs chez des personnes atteintes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes dont le test est positif ($a/a+b$) [99] c'est-à-dire la probabilité qu'une personne soit réellement malade en cas de résultats positif de test [114].

➤ La valeur prédictive négative (VPN)

La VPN est la probabilité que la personne n'ait pas la maladie si son test est négatif. C'est le nombre de vrais négatifs (tests négatifs chez des personnes indemnes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes dont le test est négatif ($d/c+d$) [114]. C'est à dire la probabilité qu'une personne soit vraiment en bonne santé en cas de résultats de test négatif [115].

1.2.2- Calcul de la VPP et VPN

Dans le cas d'une méthode semi quantitative, Le calcul de VPP et VPN se fait également à partir de tableau de contingence présenté au-dessus.

La VPP se calcul en divisant le nombre des résultats positifs des vrais malades sur le nombre total des personnes ayant des résultats positifs [114].

$$VPP = \frac{VP}{VP+FP}$$



La VPN se calcul en divisant le nombre des personnes indemnes de la maladie ayant des résultats négatifs sur le nombre total des personnes ayant des résultats négatifs [114].

$$VPN = \frac{VN}{FN+ VN}$$

1.2.3- Interprétation

Une valeur de VPP et VPN élevée sont souhaitables [116] (supérieure à 85–90%) et jugées adéquates à des fins de recherche [117].

Plus la valeur de VPP est proche de 100 % plus le nombre de faux-positifs (ou de personnes faussement considérées comme malade par le test) est faible, et plus le patient a de « chance » d'être malade en cas de test positif [114].

Plus la valeur de VPN est proche de 100 %, plus le nombre de faux-négatifs est faible, et plus le patient a de chance de ne pas être malade en cas de test négatif [114].

Ils sont qualifiés « d'extrinsèques » puisque leur valeur dépend du taux de prévalence du diagnostic dans la population où est réalisé le test, donc de la probabilité a priori (probabilité pré-test) que la personne ait une maladie, c'est-à-dire de la prévalence de la maladie dans la population considérée. Elles dépendent également des caractéristiques intrinsèques du test (sensibilité et spécificité) [102, 110].

La VPP dépend fortement de la prévalence de la maladie [117], plus la prévalence de la maladie est élevée, plus la valeur prédictive positive est élevée [115].

La VPN dépend de la sensibilité et de la prévalence. Plus on a un test très sensible (petit nombre de faux négatifs), on aura une VPN plus élevée dans l'objectif population desservie [118].

Donc plus la prévalence de la maladie est faible, plus sa valeur prédictive négative est élevée. En revanche, plus la prévalence de la maladie est élevée, plus la valeur prédictive positive est élevée. Par conséquent, plus la maladie est rare plus la VPP est faible et plus la VPN est élevée. Pour résoudre ces problèmes, des rapports de vraisemblance positifs et négatifs ont été développés [115].



Remarque : En toute pratique clinique quotidienne les valeurs prédictives est d'une importance majeure pour mesurer la précision du diagnostic. Cependant, en cas ou la prévalence est inconnue, la sensibilité et la spécificité sont les principales mesures utilisées pour évaluer la précision d'un test [118]

2- Fidélité (Précision)

2.1- Notions sur la Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité permet de déterminer des dispersions "maximales" autorisées des résultats lorsqu'on utilise une méthode donnée. Elle peut être évaluée à trois niveaux Selon les conditions d'exécution de l'essai : la répétabilité, la reproductibilité intra-laboratoire (la fidélité intermédiaire) et la reproductibilité inter-laboratoires [106, 119].

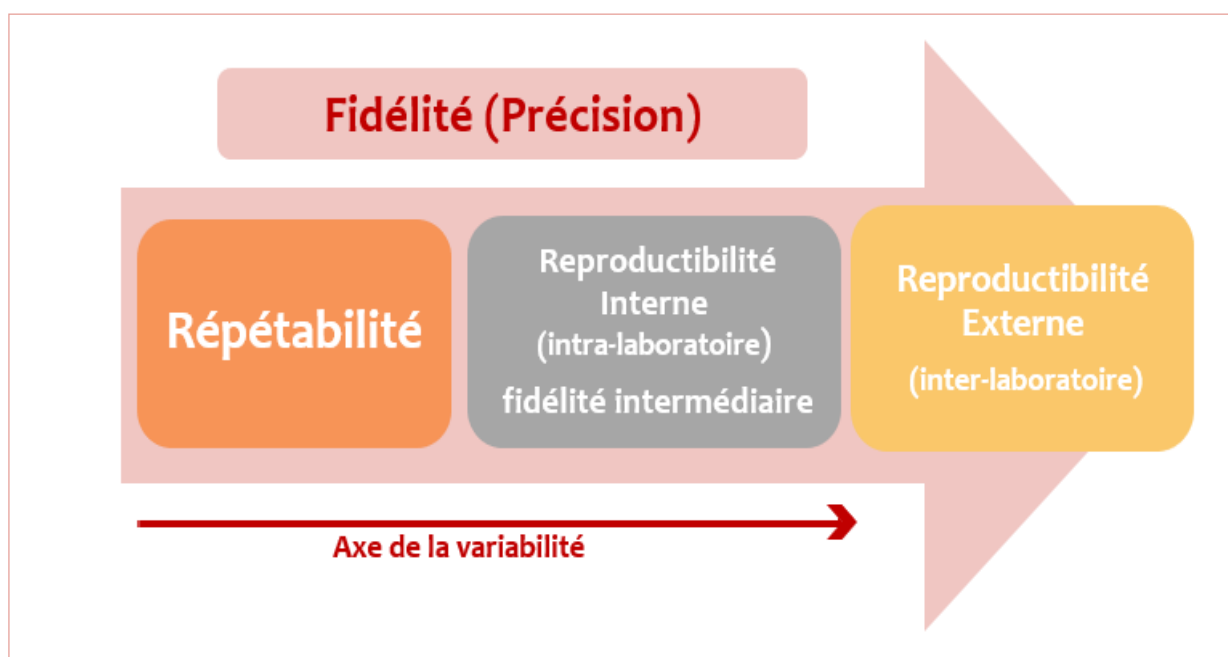


Figure 17 : les trois niveaux de la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité) selon une variabilité croissante.



Le procédé est d'autant plus fidèle que la partie aléatoire des erreurs expérimentales qui affectent les résultats est moindre. La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée [120].

Dans de nombreux cas, la fidélité n'est pas constante sur toute la gamme de validité de la méthode. Il convient alors de définir plusieurs tronçons ou « niveaux de gamme », dans lesquels il pourra être raisonnablement considéré que la fidélité est assimilable à une constante. Le calcul de fidélité sera alors réitéré pour chaque niveau de gamme [119].

Il convient si possible d'étudier simultanément la répétabilité et la fidélité intermédiaire, même si ces caractéristiques sont décrites séparément dans les normes, réglementations ou référentiels [106,119].

2.1.1- Répétabilité

La Répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même appareil, même lot de réactif, même jour, répétitions sur une courte durée [106,120].

2.1.2- Reproductibilité intra-laboratoire (la fidélité intermédiaire)

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : matériel, opérateurs, jours, lot de réactif.. [106,120].

2.1.3- Reproductibilité inter-laboratoires

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour [106,120].



2.2- Modalité pratique d'étude de la Fidélité

2.2.1- Répétabilité

Il est nécessaire d'avoir des répétitions par niveau pour identifier et quantifier les sources d'erreur. Le nombre de répétitions minimal par niveau est de 2, mais il peut être porté à 3 si le nombre de niveaux étudiés est faible ($n \leq 3$) [99].

2.2.2- Fidélité intermédiaire

Le nombre minimal de séries est de 3, quel que soit le nombre de niveaux étudiés [99].

2.3- Formule de calcul

La mesure de fidélité est calculée à partir de l'écart-type des résultats d'essais et peut être exprimée sous forme de coefficients de variation (CV) en % à partir de la valeur moyenne (\bar{x}) et l'écart type (s) [106] :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n} = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n}$$

Le coefficient de variation (CV) est défini comme :

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

2.4- Interprétation

Le CV calculé permet une évaluation de la répétabilité de la méthode exprimée en %. La définition et le mode d'expression de la précision figurent dans la norme ISO 5725-2. Lors de la vérification, le CV calculé est comparé au CV limite admissible, préalablement choisi (Fournisseurs, sociétés savantes, ...) [121].



CHAPITRE IV :
TRANSFERT DE VALEURS
DE REFERENCES



Les résultats produits par un laboratoire de biochimie médicale, doivent être comparés de façon continue à une série de valeurs dites « valeurs de référence », délimitées par des limites de référence, qui peuvent assister le médecin clinicien pour l'interprétation des résultats d'analyses de biologie médicale dans un but de diagnostic, de surveillance, de traitement ou de prévention. [122].

Le concept des valeurs de référence, issue des travaux des sociétés savantes nationales et internationales (notamment IFCC) est maintenant adopté par l'ensemble des professionnels de santé, ainsi par la plupart des organismes officiels en charge de la mise en place du dispositif législatif et réglementaire (par exemple : norme ISO 15189) [122].

La détermination des intervalles de référence repose sur des recommandations établies par des experts de la fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire (IFCC-LM). Celles-ci sont difficilement applicables en l'état dans les laboratoires de biologie médicale. Une récente révision des recommandations initiales apporte des solutions concrètes en proposant un protocole simple de vérification des intervalles de référence publiés [123].

1- Terminologie

- **Valeur normale** : C'est des valeurs mesurées à partir d'un groupe d'individus représentatifs de la population générale tout venant non triés donc non soumis à une sélection préalable et n'ayant pas modifié leurs conditions habituelles de vie [124].
- **Valeur observée** : valeur d'une variable biologique ou d'un analyte obtenu par observation ou mesure sur un sujet à tester et qui doit être comparée à des valeurs de référence, une distribution de référence, des limites de référence ou un intervalle de référence [125].
- **Individu de référence** : une personne sélectionnée sur la base de critères bien définis (supposée en bonne santé, âge, sexe, conditions de vie décrits) [125].
- **Echantillon de référence** : c'est une partie de la population de référence, il est constitué d'un nombre suffisant de personnes sélectionnées pour représenter la population de référence [126].
- **Population de référence** : rassemble tous les individus de référence [125].



- **Distribution de référence** : la distribution des valeurs de référence [125].
- **Valeurs de référence** : c'est les valeurs obtenues par l'observation ou la mesure d'une quantité définie sur un individu de référence. Elles sont la plupart du temps présentées sous forme d'intervalle de référence [125, 127]. Donc les valeurs de référence diffèrent des valeurs normales par le fait que :
 - la population est soigneusement décrite ;
 - les facteurs de variation importants sont contrôlés [124].
- **Intervalle de référence** : Il correspond aussi à l'intervalle spécifié, calculé de la distribution des valeurs obtenues à partir de population de sujets sains. Il peut varier en fonction du type d'échantillon et de la méthode utilisée. Il est borné par deux limites de référence ; une limite inférieure et une limite supérieure, celles-ci incluses. Il comprend en général 95% de la population, centré sur la médiane. Dans certains cas, une seule limite de référence peut être retenue, habituellement, la limite supérieure [128]. La détermination de l'intervalle de référence repose sur des calculs statistiques. Il est purement descriptif d'une population donnée [125].
- **Limites de référence** : une valeur dérivée de la distribution de référence et utilisée dans un but descriptif. Les limites de référence ne doivent pas être confondues avec les limites de décision, qui sont définis ci-dessous [126] elle permet de comparer une valeur observée aux données de référence et contribue à la prise de décision médicale en tenant compte des spécificités propres à la personne examinée [125]. Les limites de référence sont descriptives d'un état de santé donné et peuvent, parfois, dans des conditions bien définies servir de limites de décision [125].
- **Limite de décision** : c'est des valeurs utilisées par le clinicien comme un seuil en dessous ou au-dessus duquel une action médicale est envisagée, en tenant compte des spécificités propres à chaque personne. Elles sont donc utiles pour poser un diagnostic ou une thérapeutique et varient avec la clinique et l'objectif [125].

Généralement, il existe deux limites de référence alors que le nombre de limites de décision est variable suivant l'examen de laboratoire concerné et le contexte clinique. Dans certains cas, pour quelques analytes, les limites de référence sont remplacées par des limites de décision établies par un consensus national ou international (ex. : cholestérol total) [125].

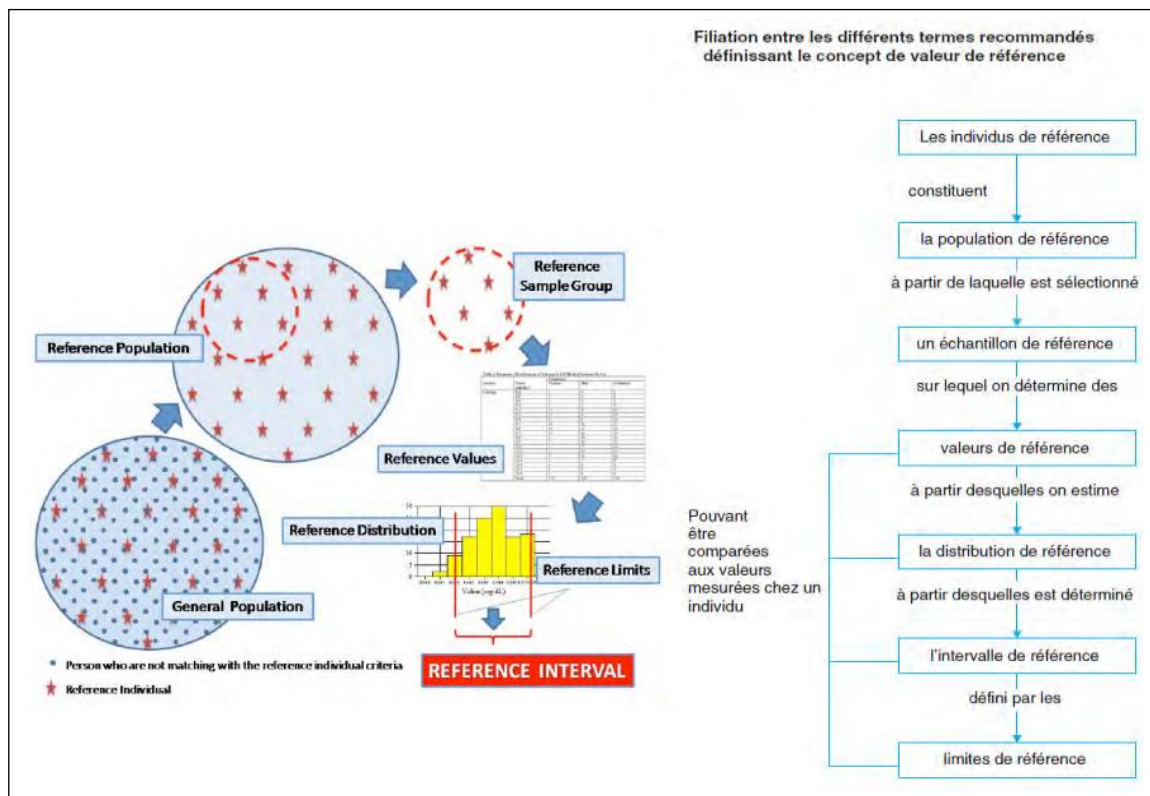


Figure 18 : Relation entre les différents termes employés dans la définition du concept des valeurs de référence [122].

2- Aspect réglementaire et recommandations

2.1- Aspect réglementaire

Les exigences de la norme ISO 15 189 :

- « Les résultats des examens de biologie médicale doivent être associés, le cas échéant, à des limites de références dans le compte rendu délivré aux patients et aux prescripteurs » [128].
- « Le laboratoire doit définir les intervalles de référence biologique ou les valeurs de décision clinique, documenter la base des intervalles de référence ou valeurs de décision et communiquer ces informations aux utilisateurs » [129].



2.2- Recommandations des organismes internationaux pour le transfert des intervalles de référence

La détermination d'un intervalle de référence, telle que recommandée par les groupes d'experts de IFCC et du CLSI, reste parfois difficile à mettre en œuvre, raison pour laquelle une procédure simple de vérification des IR indique que « les laboratoires individuels devraient s'attacher en priorité à vérifier des intervalles de référence déterminés ailleurs » a été apportée dans la dernière révision du protocole de base en collaboration avec le CLSI [123].

3- Protocole de transférabilité des intervalles de référence

Étant donné que la détermination des intervalles de référence fiables présente des difficultés, il serait très utile de pouvoir transférer un intervalle de référence d'un laboratoire à l'autre par un **processus de validation** qui est moins coûteux et plus pratique.

Les laboratoires cliniques peuvent compter de plus en plus sur d'autres laboratoires ou des fabricants de tests diagnostiques pour générer et fournir des données de valeur de référence appropriées et adéquates qui peuvent être transférées [130].

Cependant, certaines conditions doivent être acceptées, notamment que les processus de sélection de la population et de mesure (pré analytique et analytique) soient similaires pour que la procédure de transfert soit acceptable.

Deux cas de figure ont été proposés dans la version révisée des recommandations IFCC/CLSI :

- Premier cas : comparaison de systèmes analytiques ;
- Deuxième cas : comparaison de populations.

3.1- Comparaison de systèmes analytiques

Il s'agit d'un transfert à l'intérieur du même laboratoire vers un autre couple méthode instrument, ne nécessitant pas donc la sélection d'une population de référence.

- **Le protocole**

Des sérums frais de patients sont utilisés en veillant à respecter l'étendue du domaine de mesure de la méthode concernée. On calculera ensuite l'équation de la droite de régression (pente, ordonnée à l'origine, incertitude) et le coefficient de corrélation. La précision de chaque méthode devrait être de même ordre de grandeur avec des calibrants similaires.



Deux cas de figure peuvent se présenter :

❖ Il n'existe pas de différence systématique entre les deux méthodes :

- la pente de la droite de régression est voisine de 1,0 ($\pm \times \%$) ;
- l'ordonnée à l'origine (positive ou négative) est faible, inférieure aux critères définis ;
- l'étendue du domaine de mesure est similaire.

Les valeurs des deux méthodes sont comparables, les IR de l'ancienne méthode peuvent être utilisés.

❖ Il existe une différence systématique caractérisée entre les deux méthodes :

- les données des comparaisons sont homogènes ;
- la pente de la droite de régression s'écarte de 1 de plus de ($\pm \times \%$)
- l'ordonnée à l'origine (positive ou négative) est faible, inférieure aux critères définis ;
- l'étendue du domaine de mesure est similaire.

Les limites de référence pour la nouvelle méthode peuvent être recalculées en utilisant l'équation de la droite de régression [128,131].

3.2- Comparaison de populations

Elle se fait lorsqu'un laboratoire souhaite transférer les IR établis par un autre laboratoire ou un fabricant de matériel ou de réactifs ayant le même système analytique, la traçabilité de l'intervalle de référence dépasse le cadre strict d'une comparaison de systèmes analytiques, elle devient une question de comparaison de populations de référence.

Les dernières recommandations de l'IFCC-LM et du CLSI proposent plusieurs approches :

- Méthode subjective ;
- Vérification de l'intervalle de référence.

3.2.1- Méthode subjective

Les principaux critères à prendre en compte sont :

- Les critères géographiques et démographiques ;
- Les procédures pré-analytiques et analytiques ;
- La population de référence (description et précision du protocole utilisé) ;
- La méthode statistique utilisée pour déterminer l'IR.



Si ces critères de l'étude originelle sont en cohérence avec les conditions de travail et la population du laboratoire, l'IR original peut être transféré sans vérification.

La principale limite est la disposition de l'ensemble des informations requises qui reste difficile [128,123].

3.2.2- Vérification de l'intervalle de référence

Si l'un des éléments de la méthode subjective n'est pas applicable, le laboratoire doit vérifier l'IR communiqué ou publié (valeurs d'un autre laboratoire, articles scientifiques, etc.) à partir d'un échantillon de sujets apparemment sains [125].

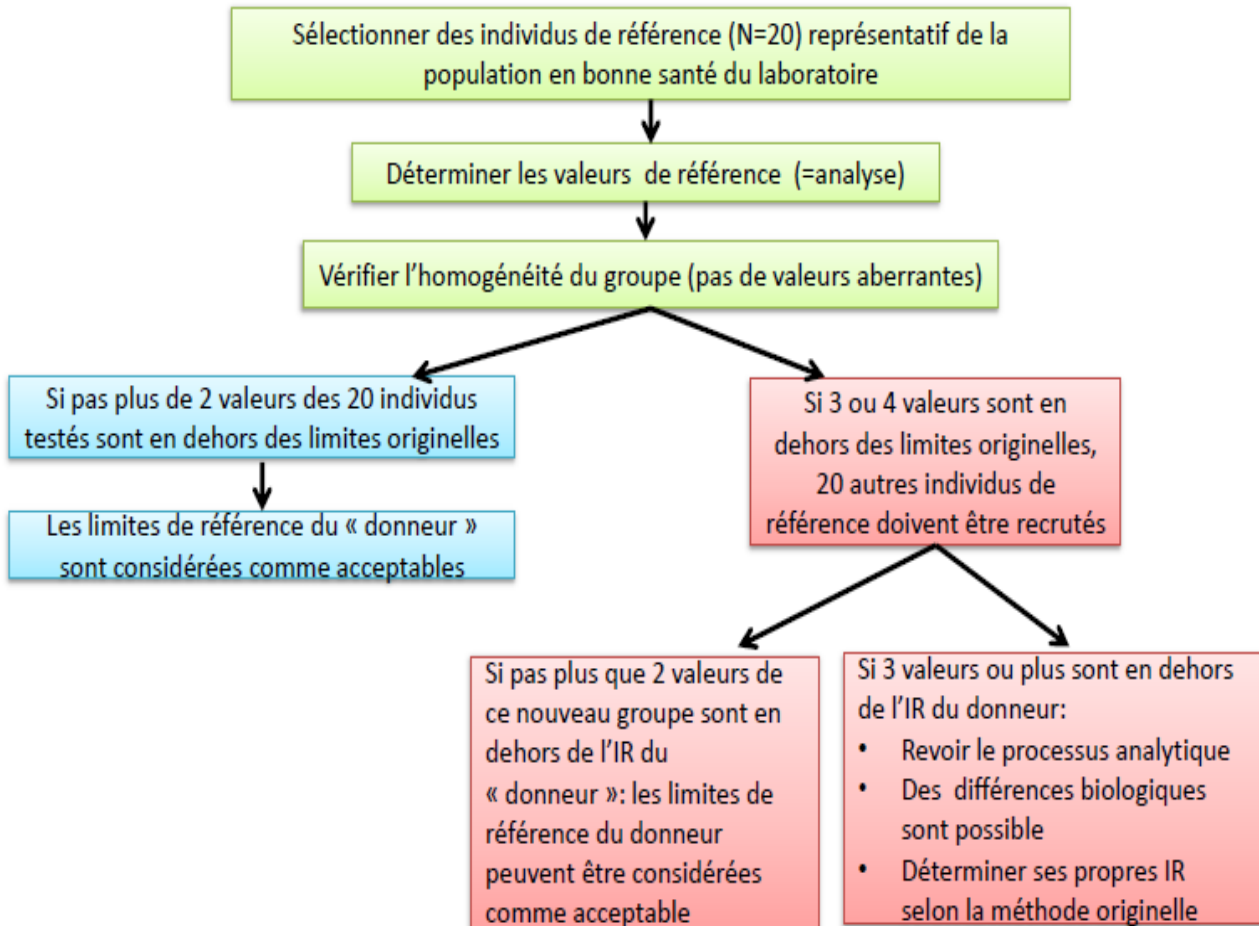
- **Le protocole :**

Sélection de 20 individus apparemment sains en tenant compte des critères d'exclusion et de partition requis (sexe, âge, absence de pathologies, prise de médicaments, etc.). Détermination des valeurs de référence avec la méthode à tester. On vérifiera l'homogénéité du groupe (en éliminant si nécessaire les valeurs aberrantes). Les conditions pré-analytiques et analytiques seront en cohérence entre la méthode testée et celle originelle.

Les limites de références à vérifier sont acceptées si le nombre de résultats en dehors des limites est inférieur ou égal à 2.

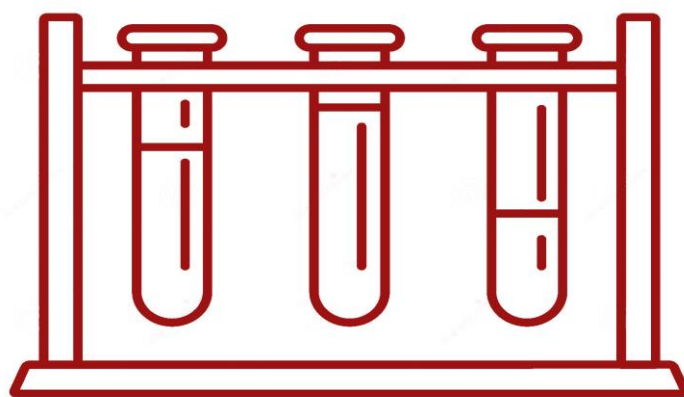
Une nouvelle sélection de 20 échantillons biologiques est analysée si le nombre de résultats en dehors des limites proposées est égal à 3 : le même protocole que précédemment est appliqué. Dans ces conditions, les limites de référence à vérifier sont acceptées si le nombre de résultats de la nouvelle sélection en dehors des limites est inférieur ou égal à 2.

Dans le cas où 4 résultats ou plus sont en dehors des limites proposées, il est conseillé de revoir la procédure analytique, d'envisager la présence de possibles différences biologiques et/ou démographiques et de déterminer les limites de référence de la méthode utilisée suivant le protocole originel [128].



IFCC/CLSI 2010 C28 A3c

Figure 19 : algorithme des actions permettant de valider un intervalle de référence préexistant selon la ligne directrice C28-A3 publiée par le CLSI et l'IFCC [131].



PARTIE PRATIQUE

Rappel des objectifs :

- Ce travail a principalement pour objectif l'appréciation des performances analytiques des techniques ELISA adaptées à l'exploration immunologique des connectivites, notamment la spécificité et la fidélité.
- Une vérification et validation de la valeur de référence de la technique ELISA appliquée au dépistage des anticorps anti-nucléaires a également été faite.

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES



1. Type d'étude

Nous avons réalisé une étude analytique descriptive qui a comme objectifs une évaluation de la fidélité et la spécificité de la technique EIISA adaptée à l'exploration immunologique des connectivites, ainsi que la vérification de l'intervalle de référence de la technique ELISA screening selon la procédure CLSI IFCC.

2. Lieu d'étude

Ce travail s'est déroulé au niveau du laboratoire de biochimie du centre hospitalo-universitaire NEDIR MOHAMED, située au centre-ville de Tizi Ouzou.

3. Période d'étude

L'étude s'est étalée sur **3** mois, du mois de mars au mois de juin **2020**.

4. Population d'étude

4.1. Echantillonnage

Cette étude a été effectuée sur un ensemble de **51** personnes.

4.1.1. Sujets sains

36 personnes ont été prélevées au niveau de la banque de sang du centre de transfusion sanguine du centre hospitalo-universitaire de Tizi Ouzou selon un ensemble de critères d'inclusion et d'exclusion.

4.1.2. Sujets malades

15 personnes dont les sérums sont affiliés par différents services au laboratoire de biochimie pour une éventuelle recherche des AAN.



4.2. Modalité de recrutements

4.2.1. Sujets sains

Le processus de recrutement des sujets sains dans notre étude s'est basé sur des critères d'inclusion et d'exclusion établis préalablement dans un questionnaire. (Annexe 1)

A. Critères d'inclusion :

- Sujet d'apparence clinique sain ;
- Un jeun de **12** heures ;
- Aucune prise médicamenteuse préalable (dans les **15** jours qui précèdent le prélèvement).

B. Critère d'exclusion :

- Les sujets ayant une pathologie chronique avec ou sans traitement ;
- Les sujets présentant une infection ;
- Les femmes enceintes ou sous contraceptives orales ;
- Les fumeurs et les alcooliques.

4.2.2. Critères de sélection des sérums des sujets malades

Principal critère est le titre de ses spécimens en auto-anticorps.

5. Matériels

5.1. Matériels du prélèvement

Le matériel utilisé pour effectuer le prélèvement est :

- ✓ Gants et garrot en plastique ;
- ✓ Coton pour la désinfection ;
- ✓ Alcool chirurgical à 90° ;
- ✓ Epicrâniennes de taille 20G ;
- ✓ Tubes secs ;
- ✓ Sparadrap ;
- ✓ Portoir.

5.2. Matériels d'analyse

5.2.1. Le consommable

- ✓ Micropipettes simple ou Eppendorf : 1000, 400, 100 et 10 μ L.
- ✓ Embouts jetables.
- ✓ Tubes secs pour la dilution des échantillons.
- ✓ Compresses.
- ✓ Récipients pour tampon de lavage HRP dilué.

5.2.2. Appareillage

- ✓ Une chaine ELISA constituée d'un :
 - Incubateur agitateur ;
 - Un laveur automatique ;
 - Un lecteur de microplaques par spectrophotométrie UV-Visible ;
 - Un logiciel de traitement de résultats en titre de densité optique « Gen5 ».
- ✓ Réfrigérateur réglé a +4C°.
- ✓ Centrifugeuse Hettich ROTOFIX.



Figure 20 : incubateur agitateur.

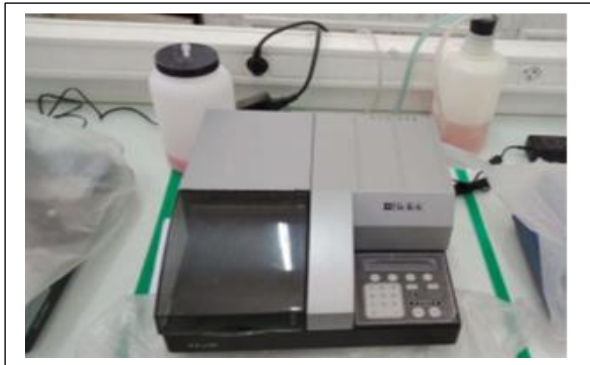


Figure 21 : laveur automatique

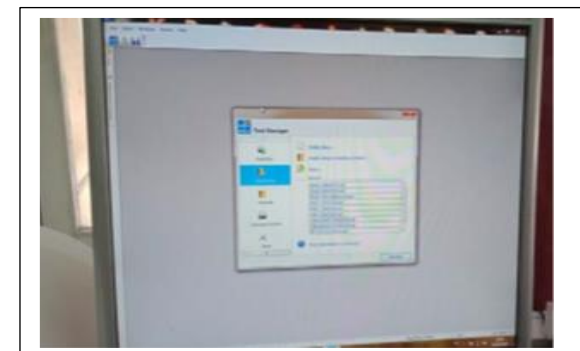


Figure 22 : Lecteur spectrophotomètre UV-Visible et logiciel de traitement de résultats.



5.2.3. Réactifs :

Tableau 18 : Répartition des réactifs dans les coffrets ELISA.

Réactifs	Coffret ELISA		
	ANA	ADN db	ENA
-Plaques de microtitration à puits ELISA ANA.	+		
-Plaques de microtitration à puits ELISA ADN dB.		+	
-Plaques de microtitration à puits ELISA ENA 6.			+
-Contrôle ELISA anti-ANA Négatif pré-dilué. -Contrôle ELISA anti-ANA faiblement positif ANA pré-dilué. -Contrôle ELISA anti-ANA fortement positif ANA pré-dilué.	+		
-Calibrateurs ADN db pré-dilué aux concentrations connues : A, B, C, D, E. -Contrôle négatif Elisa pré-dilué pour le test Elisa ADN db. -Contrôle positif Elisa pré-dilué pour le test Elisa ADN db. -Contrôle ADN sb (sérum humain pré-dilué).		+	
- Contrôle seuil profil ELISA ENA -Contrôle positif profil ELISA ENA.			+
-Diluant pour échantillons. -Tampon lavage HRP concentré. -Conjugué. -Substrat chromogène TMB.	+	+	+
-Eau distillée.	Fournis par le Laboratoire.		

+ : présence de réactifs dans le coffret d'Elisa.



6. Démarche de l'étude

6.1. Exploration immunologique des connectivites

Afin d'assurer une meilleure qualité et une traçabilité des résultats obtenus, une démarche précise en cascade est suivie au niveau du Laboratoire de biochimie du centre hospitalo-universitaire de Tizi Ouzou. Cette démarche consiste en une première étape de dépistage, à ce stade l'objectif est de détecter uniquement les AAN et donner ainsi un titre positif ou négatif. En cas de positivité, une deuxième étape est effectuée afin d'identifier avec exactitude mais aussi de doser le(s) antigène cible(s) qui constitue ainsi une étape clé pour l'établissement du diagnostic de la maladie.

En outre, chaque étape correspond à un type de technique ELISA, et chaque technique ELISA se base sur trois piliers principaux :

- Etape pré-analytique ;
- Etape analytique ;
- Etape post analytique.

6.1.1. Etape de Screening : Technique ELISA appliquée au dépistage des AAN

A. Etape pré-analytique

Cette étape est très importante dans le déroulement de notre étude, car elle s'étale de l'échantillonnage et la collecte des prélèvements vers leur enregistrement et conservation.

Elle se déroule donc en trois phases :

• Prélèvements et acheminements

Les prélèvements de sang ont été réalisés par ponction veineuse chez tous les sujets (généralement au pli du coude), en position assise depuis au moins 15 minutes. Le sang a été recueilli dans des tubes secs.

Tous les prélèvements sont laissés à température ambiante pour avoir une coagulation du sang, tout prélèvement hémolysé ou lipémique est à éviter. Tout échantillon doit être accompagné d'une fiche de renseignement soigneusement remplie et doit ainsi être enregistré.



- **Centrifugation**

Tous les échantillons subissent une centrifugation à 3500tr/min pendant une durée de 3min afin de séparer le sérum du culot globulaire. Notre analyse sera faite sur le sérum.

- **Enregistrement et conservation**

Chaque échantillon doit être enregistré sur un registre où l'on note : le nom, prénom, âge, sexe et le service.

Dans le cas où l'analyse se fait juste après séparations, les sérums peuvent être gardés 8h maximum en température ambiante. Dans le cas contraire les sérums peuvent être conservés au Laboratoire à +4C° pendant 1 mois.

B. Etape analytique du test ELISA AAN screening

- **Mode opératoire**

- Porter tous les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-26°C) avant de les utiliser. Placer uniquement le nombre nécessaire de micro-puits ou de barrettes sur le support.
- Les contrôles (fortement positif, faiblement positif et négatif) sont pré-dilués.
- Les échantillons sont dilués au 1/41 dans le diluant échantillon ANAHRP.
- Distribuer 100µL de chacun des 3 contrôles (négatif, faiblement et fortement positif) pré dilués et 100µl de chaque sérum dilué. S'assurer que les échantillons sont correctement mélangés. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.
- Recouvrir et incuber la plaque pendant 30 minutes dans un incubateur agitateur à température ambiante.
- Lavage : par le tampon dilué 3 fois. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur un papier absorbant pour enlever tout le liquide de lavage résiduel et s'assurer qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée dans les puits.
- Distribuer 100µl de conjugué dans chaque puits à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.



- Recouvrir les barrettes et incuber pendant 30 min dans un incubateur agitateur à température ambiante.
- Lavage
- Distribuer 100µl de chromogène TMB dans chaque puits à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons et laisser incubé à l'obscurité 30 min dans un incubateur agitateur à température ambiante.
- Ajouter 100µl de solution d'arrêt HRP dans chaque puits. Les échantillons positifs passeront de bleu au jaune.
- Programmer le lecteur de micropuits pour lire avec une longueur d'onde de 450 nm et mesurer la densité optique de chaque puits. Lire les résultats de la plaque moins de 30 min après avoir ajouté la solution d'arrêt.

C. Etape post analytique du test ELISA AAN screening

Après analyse des échantillons, une étape de contrôle qualité est primordiale afin de valider la manipulation et les résultats obtenus. Les titres des auto- anticorps sont donnés sous forme de densité optique, donc une étape de transfert des résultats en concentration doit être faite. En dernier lieu, l'interprétation se fait selon un ensemble de critères et varie en fonction de la phase de la maladie.

• Contrôle de qualité du test ELISA AAN screening

-Les contrôles ELISA fortement positifs, faiblement positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque série de test afin de s'assurer de la stabilité des réactifs et du bon déroulement de la procédure.

-Pour valider les résultats obtenus, tous les critères décrits ci-dessous doivent être vérifiés ; Un seul critère non vérifié est suffisant pour considérer le test comme non valide et à refaire :

✓ La densité optique du contrôle fortement positif doit être supérieure à celle du contrôle faiblement positif ; celle du contrôle faiblement positif doit être supérieure à celle du contrôle négatif.

✓ La densité optique du contrôle fortement positif doit être supérieure à 1.0, celle du contrôle négatif doit être inférieure à 0,15.



✓ L'absorbance du contrôle ELISA faiblement positif doit être 2 fois supérieure à celle du contrôle négatif, ou supérieure à 0,15.

- **Calculs des résultats**

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

- La valeur du contrôle faible est mentionnée sur l'étiquette du flacon (dans notre cas = 25).

- **Interprétation des titres des anticorps anti-nucléaires obtenus**

Tableau 19 : Interprétation des titres des anticorps-AAN obtenus.

Résultats AAN	Interprétations
< 20 UE/ml	Négatif
20-60 UE/ml	Modérément positif
> 60 UE/ml	Fortement positif

UE : unité enzymatique.

6.1.2. Etape de dosage : Technique ELISA appliquée au dosage des anticorps anti ADN natif.

A. Etape pré-analytique

Identique à celle du test ELISA AAN screening (déjà détaillée au-dessus).



B. Etape analytique

- **Mode opératoire du test ELISA anti-ADN db :**

- Les contrôles et calibrateurs sont pré-dilués.
- Déposer 100µl de chaque contrôle et standard pré-dilués et 100µl de chaque échantillon dilué (1/101) dans les puits appropriés suivant le plan de la plaque. -Incuber pendant 30min dans un incubateur agitateur à température ambiante.
- Lavage de la plaque : Après incubation laver 3 fois la plaque avec 200µl à 300µl de tampon de lavage en utilisant un laveur automatique. Après lavage final, renverser la plaque et sécher les puits en tapant la plaque sur du papier absorbant.
- Addition du conjugué : Déposer 100µl de conjugué par puits. Incuber dans un incubateur agitateur pendant 30min à température ambiante.
- Lavage de la plaque : de même façon que précédemment.
- Addition du substrat TMB : Déposer 100µl de TMB dans chaque puits. Incuber dans l'obscurité pendant 30min dans un incubateur agitateur à température ambiante.
- Arrêt de la réaction : Ajouter 100µl de solution d'arrêt dans chaque puits ; ceci induit un changement de couleur du bleu au jaune. Incuber et agiter pendant 30 min à température ambiante.
- Mesure de la densité optique : La DO de chaque puits est lue à 450nm à l'aide d'un lecteur de plaques.

<input type="radio"/>	A1 : Calibrateur A	<input type="radio"/>	a partir e A2 échantillon
<input type="radio"/>	B1 : Calibrateur B		
<input type="radio"/>	C1 : Calibrateur C		
<input type="radio"/>	D1 : Calibrateur D		
<input type="radio"/>	E1 : Calibrateur E		
<input type="radio"/>	F1 : Contrôle positif		
<input type="radio"/>	G1 : Contrôle négatif		
<input type="radio"/>	H1 : Standard		

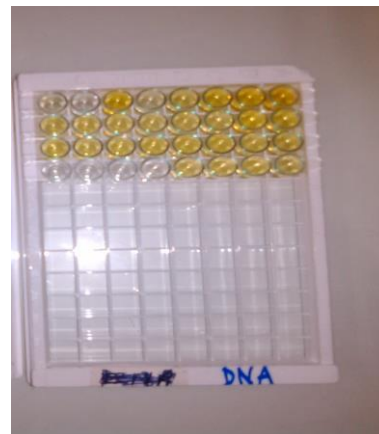


Figure 23 : microplaque ELISA a puits recouverts d'antigènes ADN db.



C. Etape post analytique

• Contrôle de qualité du test ELISA anti-ADN db

Pour valider le test tous les critères suivants doivent être respectés :

- les calibrateurs, le contrôle positif ADN db, le contrôle négatif et le contrôle ADN sb doivent être inclus dans chaque série de tests.
- les valeurs obtenues pour tous les contrôles doivent être dans les gammes spécifiées sur la fiche de contrôle qualité : contrôle négatif <30 UI/ml, contrôle positif = [220-380]UI/ml et le contrôle ST < 50UI/ml.
- la forme de la courbe doit être similaire à celle fourni sur le certificat de contrôle qualité.
- si les critères ci-dessus ne sont pas respectés de test est invalide et doit être refait.

• Calcul des résultats du test ELISA anti-ADN db

L'établissement de la courbe de calibration se fait automatiquement par le logiciel, avec des concentrations en anticorps anti ADN db (échelle logarithmique) sur l'axe des X et la densité optique de chaque calibrateur sur l'axe de Y (échelle linéaire). Le choix du tracé de courbes est fait en faveur de celui qui donne des résultats meilleurs.

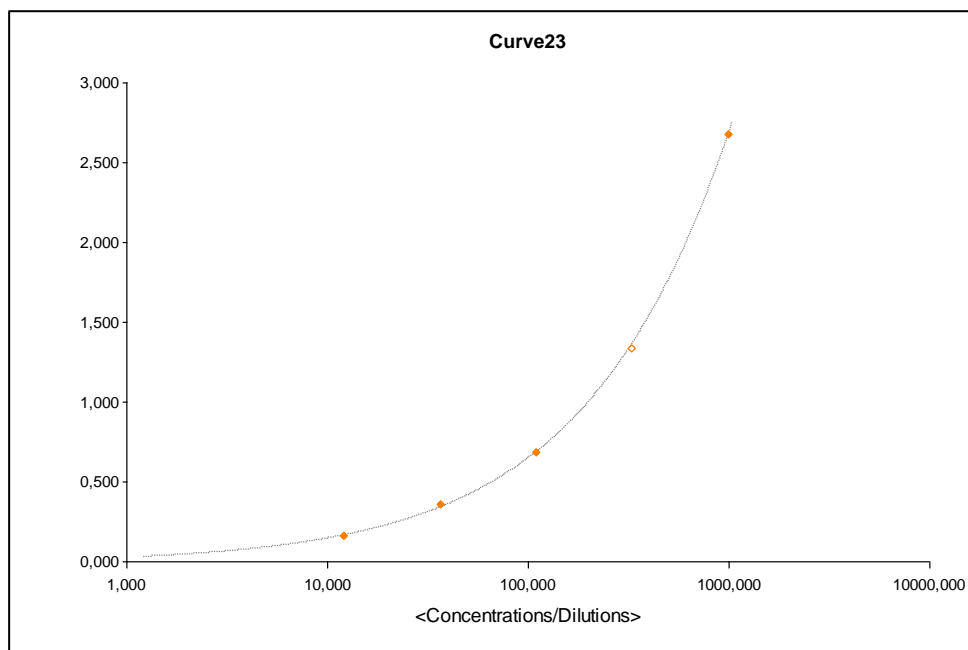


Figure 24 : courbe de calibration obtenue lors d'un test ELISA anti-ADN db.



- **Interprétation des titres des anticorps anti-ADN db obtenus**

Tableau 20 : Interprétation des titres des anticorps-ADN db obtenus.

Résultats AAN	Interprétations
< 30 UI/ml	Négatif
30-75 UI/ml	Douteux
> 75 UI/ml	Positif

UI : unité internationale.

6.1.3. Etape Identification : Identification des Anticorps anti-antigènes nucléaires solubles ENA6

A. Etape pré-analytique

Identique à celle du test ELISA AAN screening (déjà détaillée au-dessus).

B. Etape analytique

- **Mode opératoire du test ELISA anti-ENA6**

- Déposer 100 µL de chaque contrôle pré-dilué et échantillon dilué à 1/101 dans les puits appropriés.
 - Incuber pendant 30 minutes dans un incubateur agitateur à température ambiante puis laver.
 - Ajouter 100 µL de conjugué par puits.
 - Incuber pendant 30 minutes puis laver.
 - Ajouter 100 µL de substrat par puits.
 - Incuber pendant 30 minutes.
 - Ajouter 100 µL de solution d'arrêt par puits.
 - Mesurer l'absorbance à 450 nm.
- Chaque colonne est dédiée uniquement pour un seul échantillon.

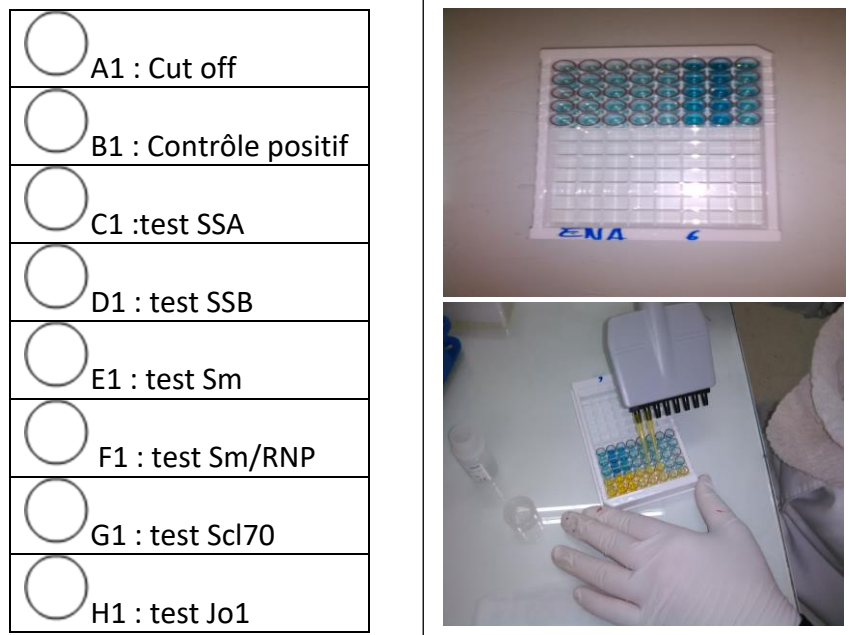


Figure 25 : microplaque ELISA a puits recouverts d'antigènes ENA.

C. Etape post analytique

- **Contrôle de qualité du test ELISA anti-ENA6**

Pour valider le test tous les critères suivants doivent être respectés :

- le contrôle seuil et le contrôle positif doivent être inclus dans chaque série de tests.
- la densité optique obtenue pour le contrôle seuil et le résultat ENA du contrôle positif doivent-être dans les plages spécifiées sur le certificat de contrôle qualité : DO cut off = [0.1-1] UI/ml et le contrôle positif [25-55] UI/ml.
- si les critères ci-dessus ne sont pas respectés le test est invalide et doit être refait.

- **Calcul des résultats du test ELISA anti-ENA6**

$$\text{Valeur de la concentration de l'échantillon} = \frac{\text{DO de l'échantillon}}{\text{DO du Cut off}} \times 10$$



- **Interprétation des titres des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles « ENA » obtenus**

Tableau 21 : Interprétation des titres des anticorps anti- ENA obtenus

Résultats AAN	Interprétations
< 8.0 UE/ml	Négatif
8.0-12 UE/ml	Douteux
> 12 UE/ml	Positif

UE : unité enzymatique.

6.2. Paramètres étudiés

6.2.1. Paramètres de performances

➤ **Technique ELISA appliquée au dépistage des anticorps antinucléaire (ANA screening)**

A. Fidélité

Pour évaluer la fidélité de la technique ELISA screening, **09** échantillons ont été analysés.

✓ **La répétabilité (intra-essai)**

L'évaluation de la répétabilité a pour but de déterminer l'étroitesse des résultats individuels obtenus au cours de l'expérience.

4 échantillons ont été utilisés : **2** négatives et **2** modérément positives où chacun a été répété 10 fois sur la même plaque, utilisant le même lot de réactif QUANTA Lite ANA ELISA, par le même opérateur dans le même jour.

✓ **La fidélité intermédiaire (inter-essai)**

La fidélité intermédiaire permet l'évaluation de l'étroitesse des résultats obtenus au cours des 04 différentes expériences effectuées sur 04 jours différents par



différents opérateurs en utilisant une seul fois **5** échantillons : un négatif, trois modérément positifs et un échantillon fortement positif.

B. La Spécificité

La Spécificité de la technique ELISA appliquée au dépistage des anticorps anti-nucléaires ANA SCREEN a été évaluée en utilisant **36** échantillons de sérums des sujets d'apparence clinique sains (AAN négatif).

Chaque échantillon a été lancé une seule fois sur la même plaque en utilisant le même lot de réactif QUANTA Lite ANA ELISA et par le même opérateur dans le même jour.

➤ **Technique ELISA appliquée au dosage des anticorps anti-DNA**

A. La fidélité

3 échantillons ont été analysés, leurs concentrations doivent être à l'intérieure de la gamme de calibration.

✓ **La répétabilité (intra-essai)**

L'évaluation de la répétabilité a pour but de déterminer l'étroitesse des résultats individuels obtenus au cours de l'expérience où chaque échantillon a subi

11 répétitions sur la même plaque ELISA, en utilisant le même lot de réactifs QUANTA Lite DNA, par le même opérateur dans le même jour.

✓ **La fidélité intermédiaire (inter-essai)**

La fidélité intermédiaire permet l'évaluation de l'étroitesse des résultats obtenus au cours des 03 différentes expériences effectuées par différents opérateurs sur 3 jours où chaque échantillon positif a subi 3 répétitions.



B. La spécificité

L'évaluation de la spécificité de la technique ELISA appliquée au dosage des anticorps anti-DNA a été effectuée en lançant **36** échantillons de patients d'apparence clinique sains (négatifs en Anti-DNA db).

Chaque échantillon est lancé une seule fois sur la même plaque ELISA, en utilisant le même lot de réactifs QUANTA Lite DNA, par le même opérateur dans le même jour.

➤ **Technique ELISA appliquée pour l'identification et le dosage des anticorps anti-antigènes solubles ENA-6**

A. La Fidélité

3 échantillons ont été analysés.

✓ **La répétabilité (intra-essai)**

La répétabilité est évaluée en utilisant un seul échantillon positif.

Ce dernier a été répété 03 fois sur la même plaque ELISA, en utilisant le même lot de réactifs QUANTA Lite ENA-6, par le même opérateur dans le même jour.

✓ **La fidélité intermédiaire (inter-essai)**

Elle est évaluée en utilisant **02** échantillons positifs. Chacun de ces deux échantillons a subi 03 répétitions par un opérateur différent sur 03 jours.

6.2.2- Transfert et vérification des valeurs de références

A- Population de l'étude

Cette étude a concerné une population présumée saine. Il s'agit d'un groupe de 20 personnes (hommes et femmes) appartenant aux différentes tranches d'âge (19 à 50ans) provenant des wilayas de Tizi-Ouzou, Bouira et Boumerdes.

B- Echantillonnage

Nous avons utilisé une technique d'échantillonnage directe basée sur une sélection à priori mise en place avant d'effectuer le prélèvement sanguin.

C- Stratégie de vérification de la valeur de référence

Un protocole de validation a été établi pour vérifier la valeur de référence proposée par le fournisseur et qui est égale à 20 UA/ml à partir de laquelle un échantillon est considéré comme positif ou négatif en AAN, tout en suivant les recommandations publiées par le CLSI et IFCC.

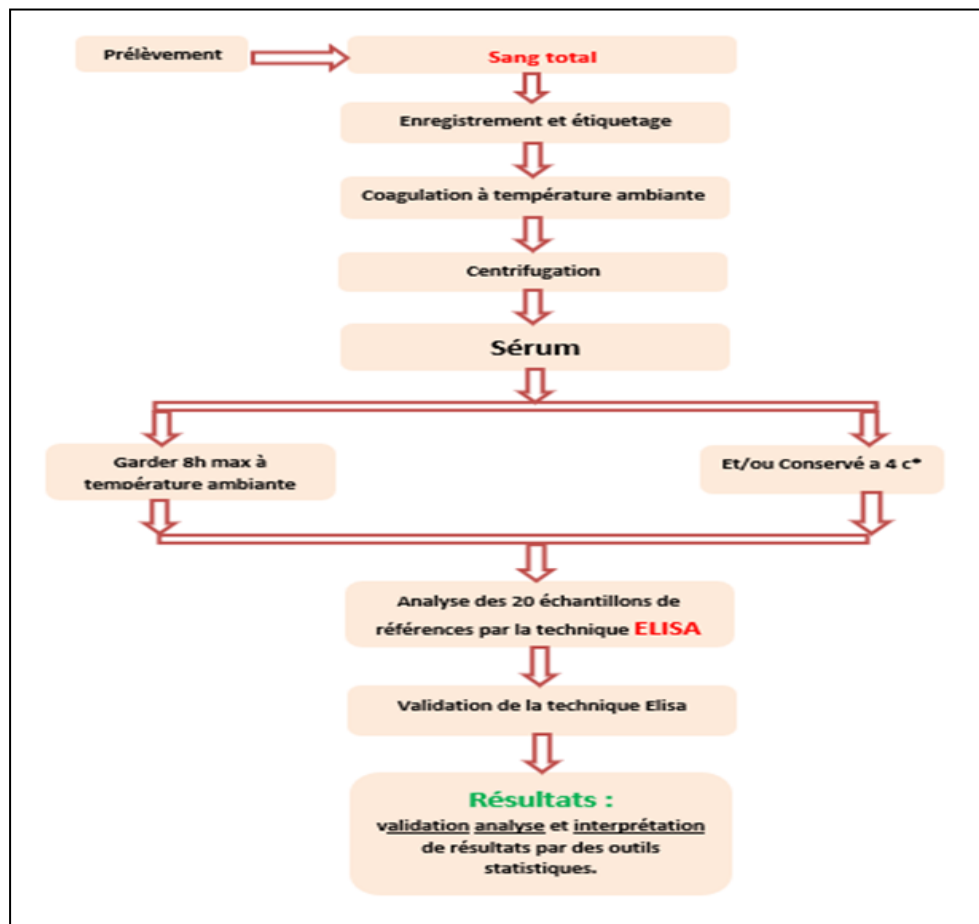


Figure 26 : schéma général sur la méthode de traitements des échantillons destinés à être analysés par la technique ELISA pour la vérification d'une valeur de référence.



7-Analyse statistique :

- Pour les variables quantitatives on a calculé les moyennes, les écarts-types, les coefficients de variations (CV) et les moyennes de coefficient de variation.
- Pour les variables qualitatives exprimées sous forme de pourcentages et d'effectifs.

Ces différents paramètres ont été calculés à l'aide du logiciel Microsoft EXCEL 2016.

CHAPITRE II : RESULTATS

1. Principales caractéristiques de la population choisie pour évaluer la spécificité de la technique ELISA screening et ELISA dosage

1.1. Répartition de la population selon l'âge

Tableau 22 : les différentes tranches d'âge avec le pourcentage des individus incriminés dans l'étude de la spécificité.

l'age	l'effectif	pourcentage
[10-20[2	6%
[20-30[14	38,88%
[30-40[9	25%
[40-50[11	30,55%
totale	36	100%

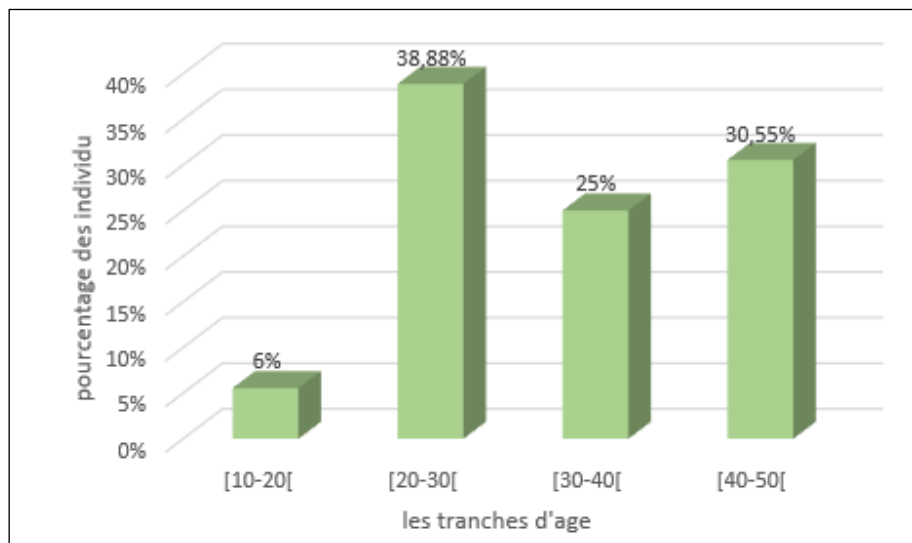


Figure 27 : répartition de la population d'étude selon les tranches d'âge.

- **Interprétation de graphe**

- D'après ce graphe, on constate que les individus de la tranche d'âge [20-30[ans sont les plus nombreux et représentent près de 40 % de l'effectif total.
- L'âge moyen était de 33.6 avec des extrêmes d'âge de 19 ans et 50 ans.

1.2. Répartition de la population selon le sexe

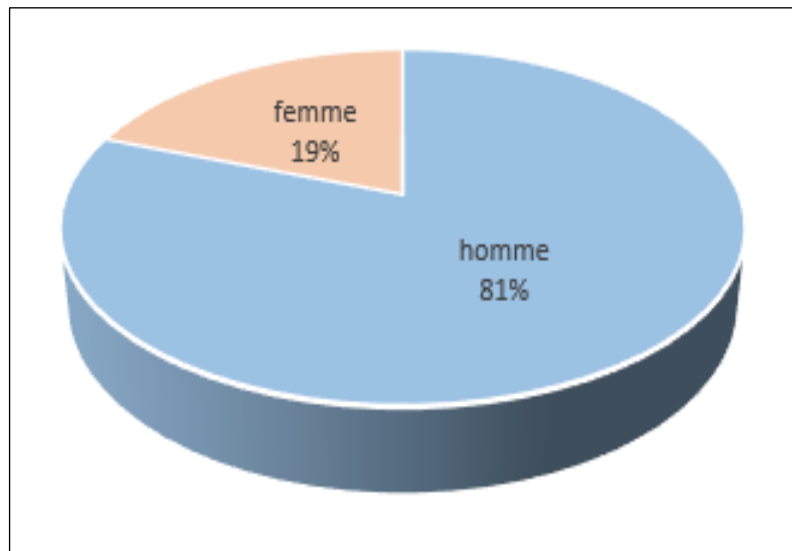


Figure 28 : Répartition des individus de la population d'étude selon le sexe.

- **Interprétation de graphe**

Notre groupe d'étude comporte :

- ✓ 29 hommes ce qui correspond à un pourcentage de 81% ;
- ✓ 7 femmes ce qui correspond à un pourcentage de 19%.

2. Les résultats de l'évaluation de la fidélité et la Spécificité de la technique ELISA

Les résultats de tous les tests ELISA lancés ont été validés selon les critères de validations spécifiés sur la fiche de contrôle qualité.



2.1. Résultats de l'évaluation de la fidélité et la spécificité de la technique ELISA screening et étude comparative entre la technique IFI et ELISA

2.1.1. La Fidélité

A. La Répétabilité (Intra-Essai)

Tableau 23 : représentation tabulaire des concentrations en AAN des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité.

	NEGATIFS		MODEREMENT POSITIFS	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4
Répétition 1	11,59	17,80	35,10	43,47
Répétition 2	12,26	15,03	43,48	42,53
Répétition 3	11,08	14,43	36,42	42,98
Répétition 4	11,49	15,41	39,09	41,52
Répétition 5	10,61	17,94	40,81	42,33
Répétition 6	10,64	17,74	37,23	41,07
Répétition 7	12,26	18,45	38,21	41,15
Répétition 8	10,27	18,48	42,53	42,05
Répétition 9	10,41	15,57	33,48	39,12
Répétition 10	10,24	18,72	40,51	39,20
Moyenne	11,08	16,96	38,69	41,54
Ecart type	0,78	1,64	3,22	1,46
CV %	7,03	9,70	8,32	3,53

- **Interprétation**

Le Coefficient de Variation CV% moyen des 4 échantillons (2 négatifs et 2 modérément positifs) est de **7,15%** avec un maximum de **9,70%** et un minimum de **3,53%**.

**B. La Fidélité intermédiaire (Inter-Essai)**

Tableau 24 : représentation tabulaire des concentrations en AAN des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la fidélité intermédiaire.

	NEGATIF	MODEREMENT POSITIFS			FORTEMENT POSITIF
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5
Répétition 1	13,43	40,99	51,75	46,31	119,97
Répétition 2	15,51	39,55	50,65	51,27	125,77
Répétition 3	12,40	45,33	45,33	48,61	127,58
Répétition 4	15,51	41,88	44,62	53,38	142,34
Moyenne	14,21	41,94	48,09	49,89	128,91
Ecart type	1,56	2,46	3,63	3,08	9,52
CV %	10,97	5,86	7,55	6,18	7,38

- **Interprétation**

Le Coefficient de Variation CV% moyen des 5 échantillons analysés (1 négatif, 2 modérément positifs et 1 fortement positif) est de **7,58%** avec un maximum de **10,97%** et un minimum de **5,86%**



2.1.2. La spécificité

Tableau 25 : représentation tabulaire des concentrations en AAN des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la spécificité.

Echantillons	Concentration	Résultats
Echantillon 1	19,46	Négatif
Echantillon 2	19,93	Négatif
Echantillon 3	17,4	Négatif
Echantillon 4	14,55	Négatif
Echantillon 5	14,87	Négatif
Echantillon 6	26,34	Positif
Echantillon 7	15,34	Négatif
Echantillon 8	16,45	Négatif
Echantillon 9	15,34	Négatif
Echantillon 10	13,6	Négatif
Echantillon 11	15,5	Négatif
Echantillon 12	15,9	Négatif
Echantillon 13	16,29	Négatif
Echantillon 14	17,56	Négatif
Echantillon 15	15,9	Négatif
Echantillon 16	16,13	Négatif
Echantillon 17	20,64	Douteux
Echantillon 18	10,75	Négatif

Echantillons	Concentration	Résultats
Echantillon 19	13,84	Négatif
Echantillon 20	16,21	Négatif
Echantillon 21	19,62	Négatif
Echantillon 22	25,94	Positif
Echantillon 23	12,57	Négatif
Echantillon 24	13,37	Négatif
Echantillon 25	15,03	Négatif
Echantillon 26	18,03	Négatif
Echantillon 27	19,46	Négatif
Echantillon 28	18,19	Négatif
Echantillon 29	10,36	Négatif
Echantillon 30	14,24	Négatif
Echantillon 31	12,81	Négatif
Echantillon 32	9,17	Négatif
Echantillon 33	10,20	Négatif
Echantillon 34	12,97	Négatif
Echantillon 35	9,17	Négatif
Echantillon 36	11,70	Négatif

- Répartition des échantillons selon la nature de résultats de test Elisa

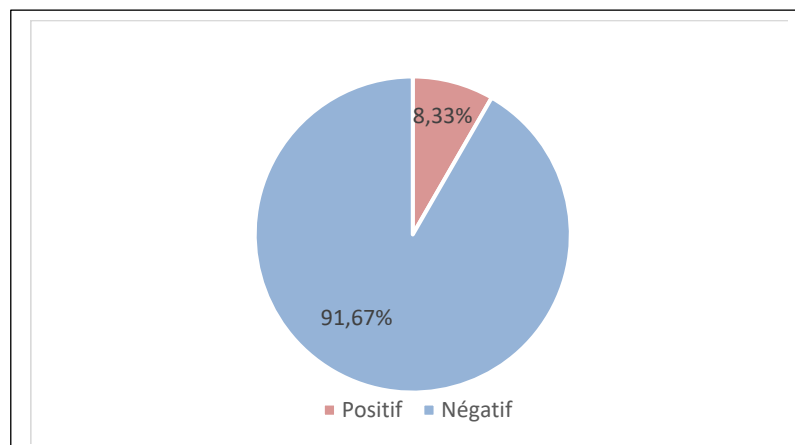


Figure 29 : Répartition des échantillons selon la nature de résultat.



- **Interprétation**

Sur 36 patients (d'apparence clinique saine) considérés comme négatifs en AAN, l'ELISA a correctement détecté 34 patients AAN négatifs, deux patients qui présente un titre d'AAN Positifs > **20 UE/ml** et un patient qui présente un titre d'AAN douteux proche de **20 UE/ml**.

La Spécificité de la technique ELISA appliquée au dépistage des anticorps antinucléaires est de : **91,67%**.

2.1.3. Etude comparative entre la technique immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2 et la technique immuno enzymatique ELISA dans la recherche des anticorps antinucléaire

L'exploration immunologique des connectivites suit une démarche standardisée, initiée par une étape de dépistage (screening) qui en cas de positivité accomplie par une étape d'identification [132].

Le dépistage s'effectue principalement par deux techniques, à savoir : l'IFI sur cellules HEp-2 et l'ELISA.

Les résultats fournis par ces deux techniques dépendent de leur sensibilité, spécificité et de leur reproductibilité [133]. Afin de déceler la méthode de dépistage la plus fiable pour la recherche des AAN (meilleure sensibilité, une meilleure spécificité et donc un diagnostic de certitude et une prise en charge thérapeutique adaptée), une étude comparative entre les deux technique IFI sur cellules HEp-2 et ELISA s'impose [134].

Notre mémoire devait traiter cette étude comparative entre l'IFI sur cellules HEp-2 et l'ELISA. Hélas, vu les conditions sanitaires étouffantes liées à la pandémie du COVID-19 le travail n'a pas pu être accompli. Néanmoins, la démarche d'étude comparative a été tracée et un protocole a été établi, ce dernier est résumé comme suit :

- 100 échantillons devaient être traités, ils proviennent du laboratoire d'immunologie du CHU de Bab el oued d'Alger.



- Chaque patient devait être accompagné d'un résumé clinique, mais aussi des résultats du test IFI sur cellules HEp-2 pour le dépistage des AAN.
- Après avoir reçus ces échantillons, une étape de recherche des AAN par la technique ELISA a été programmée suivant la même démarche déjà citée au-dessus.
- Par la suite, les résultats obtenus par la technique ELISA seront classés en échantillons à test ELISA positif et échantillons à test ELISA négatif et le tout sera confronter dans un tableau de contingence qui va nous présenter au même temps les résultats du test IFI sur cellules HEp-2 et les résultats du test ELISA pour ces mêmes échantillons

Tableau 26 : tableau de contingence 2*2 pour le calcul de la sensibilité et la spécificité de la technique ELISA [135]

	Présence de AAN	Absence des AAN	Totale test	Valeur prédictives
ELISA positif	Vrais positifs VP	Faux positifs FP	Totale positifs TP	VPP= $VP/(VP+FP)$
ELISA négatif	Faux négatifs FN	Vrai négatif VN	Totale négatifs TN	VPN= $VN/(VN+FN)$
Total tests	Totale P-AAN	Totale A-AAN		
	Sensibilité $Se = VP/(VP+FN)$	Spécificité $Sp = VN/(VN+FP)$		

A partir de ce tableau, on peut calculer la valeur de la sensibilité, de la spécificité, VPP et VPN de la technique ELISA par rapport à la technique de référence IFI sur cellules HEp-2 (gold standard).



2.2. Résultats de l'évaluation de la fidélité et la spécificité de la technique ELISA appliquée au dosage des anticorps anti-DNA

2.2.1. La Fidélité

A. La Répétabilité (Intra-Essai)

Tableau 27 : représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti-DNA des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité.

	POSITIFS		
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Répétition 1	42,84	74,66	176,27
Répétition 2	37,68	69,05	177,39
Répétition 3	44,1	72,45	174,04
Répétition 4	44,86	73,86	178,29
Répétition 5	48,07	72,85	175,6
Répétition 6	42,71	76,07	173,37
Répétition 7	51,75	68,85	166,27
Répétition 8	42,71	71,05	174,93
Répétition 9	42,84	71,45	170,04
Répétition 10	41,84	69,85	170,04
Répétition 11	38,53	72,65	165,39
Calibrateur A	1006,58		
Calibrateur B	324,48		
Calibrateur C	124,96		
Calibrateur D	44,74		
Calibrateur E	<0,00		
Moyenne	43,45	72,07	172,88
Ecart type	3,93	2,3	4,36
CV %	9,05	3,19	2,52

- **Interprétation**

Le Coefficient de Variation CV% moyen des 3 échantillons (Positifs) est de **4,92%** avec un maximum de **9,05%** et un minimum de **2,52%**.



B. La Fidélité intermédiaire (Inter-Essai)

Tableau 28 : représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti-DNA des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la spécificité.

	POSITIFS		
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Répétition 1	75,25	86,07	132,62
Répétition 2	93,24	79,28	108,38
Répétition 3	96,68	104,11	124,19
Calibrateur A	1006,58	1000,33	1001,29
Calibrateur B	324,49	329,73	328,62
Calibrateur C	124,97	114,64	118,93
Calibrateur D	44,75	39,18	39,59
Calibrateur E	<0,000	9,35	5,50
Moyenne	88,39	89,82	121,73
Ecart type	11,51	12,83	12,3
CV %	13,02	14,29	10,11

- **Interprétation**

Le **Coefficient de Variation CV% moyen** des 3 échantillons (Positifs) est de **12,47%** avec un maximum de **13,02%** et un minimum de **10,11%**.



2.2.2. La spécificité

Tableau29 : représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti-DNA des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la spécificité.

Echantillons	Concentration	Résultats
Echantillon 1	12,91	Négatif
Echantillon 2	17,889	Négatif
Echantillon 3	60,905	Douteux
Echantillon 4	< 30	Négatif
Echantillon 5	< 30	Négatif
Echantillon 6	< 30	Négatif
Echantillon 7	2,869	Négatif
Echantillon 8	< 30	Négatif
Echantillon 9	< 30	Négatif
Echantillon 10	< 30	Négatif
Echantillon 11	< 30	Négatif
Echantillon 12	< 30	Négatif
Echantillon 13	< 30	Négatif
Echantillon 14	0,856	Négatif
Echantillon 15	< 30	Négatif
Echantillon 16	< 30	Négatif
Echantillon 17	11,214	Négatif
Echantillon 18	< 30	Négatif

Echantillons	Concentration	Résultats
Echantillon 19	< 30	Négatif
Echantillon 20	< 30	Négatif
Echantillon 21	< 30	Négatif
Echantillon 22	< 30	Négatif
Echantillon 23	< 30	Négatif
Echantillon 24	< 30	Négatif
Echantillon 25	< 30	Négatif
Echantillon 26	< 30	Négatif
Echantillon 27	< 30	Négatif
Echantillon 28	< 30	Négatif
Echantillon 29	65,806	Douteux
Echantillon 30	< 30	Négatif
Echantillon 31	< 30	Négatif
Echantillon 32	< 30	Négatif
Echantillon 33	< 30	Négatif
Echantillon 34	< 30	Négatif
Echantillon 35	< 30	Négatif
Echantillon 36	< 30	Négatif

- Répartition des échantillons selon la nature de résultats de test Elisa

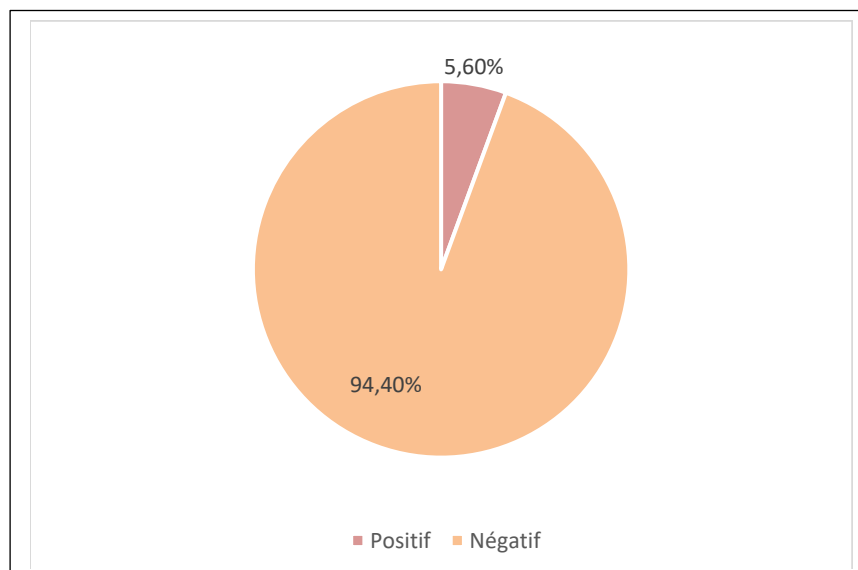


Figure 30 : Répartition des échantillons selon la nature de résultat.



- **Interprétation**

Sur 36 patients (d'apparence clinique saine) considérés comme négatifs en anti-ADN db, l'ELISA a correctement détecté 34 patients Anti-ADN db négatifs et deux patients qui présentent un titre anti-ADN db douteux entre **[30 – 75] UI/ml**.

La Spécificité de la technique ELISA appliquée au dosage des anticorps anti-DNA est de : **94,4%**.

2.3. Résultats de l'évaluation de la fidélité de la technique ELISA appliquée à l'identification des anticorps anti- antigènes solubles ENA-6 :

2.3.1. La Fidélité

A. La Répétabilité (Intra-Essai)

Tableau 30 : représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti- antigènes solubles des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la répétabilité.

	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Moyenne	Ecart type	CV %
SSA	19,82	18,36	19,81	19,33	0,84	4,35
SSB	6,72	6,65	6,79	6,72	0,07	1,04
SM	5,82	6,12	6,22	6,05	0,20	3,38
RNP/SM	6,39	6,46	7,11	6,65	0,40	5,96
SCL70	5,70	5,19	5,81	5,57	0,33	5,92
JO1	4,66	6,30	6,15	5,70	0,91	15,97

- **Interprétation**

Le Coefficient de Variation CV% moyen de toutes les spécificités (Antigènes solubles) de cet échantillon est de **6,10%** avec un maximum de **15,97%** et un minimum de **1,04%**.

**B. La Fidélité intermédiaire (Inter-Essai)**

Tableau 31 : représentation tabulaire des concentrations en anticorps anti- antigènes solubles des différents échantillons utilisés lors de l'évaluation de la fidélité intermédiaire.

		Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Moyenne	Ecart type	CV %
ECH1	SSA	17,56	19,71	21,26	19,51	1,86	9,54
	SSB	3,39	2,91	3,81	3,37	0,45	13,33
	SM	3,31	3,52	2,74	3,19	0,40	12,65
	RNP/SM	3,56	3,79	2,95	3,43	0,43	12,55
	SCL70	3,03	3,15	3,84	3,34	0,44	13,14
	JO1	3,43	3,62	3,79	3,61	0,18	4,98
ECH2	SSA	21,86	16,83	19,82	19,50	2,53	12,97
	SSB	3,77	4,19	3,09	3,68	0,56	15,11
	SM	4,99	3,90	4,49	4,46	0,55	12,26
	RNP/SM	7,40	5,76	5,94	6,37	0,90	14,12
	SCL70	5,97	4,69	4,71	5,12	0,73	14,27
	JO1	6,95	5,56	5,43	5,98	0,84	14,07

• Interprétation

- Premier Echantillon : **Le Coefficient de Variation CV% moyen** de toutes les spécificités (Antigènes solubles) de cet échantillon est de **11,03%** avec un maximum de **13,33%** et un minimum de **4,98%**.
- Deuxième Echantillon : **Le Coefficient de Variation CV% moyen** de toutes les spécificités (Antigènes solubles) de cet échantillon qui a subi 3 répétitions étalées sur 3 jours est de **13,8%** avec un maximum de **15,11%** et un minimum de **12,26%**.



3. Résultats de la vérification et transfert des valeurs de références

3.1. Les valeurs obtenues

Tableau 32 : Données quantitatives et qualitatives des 20 échantillons des individus de référence.

Numéro d'échantillon	Sexe	Age	Concentration UI/ml
Echantillon 1	Homme	34 ans	10,36
Echantillon 2	Homme	44 ans	14,56
Echantillon 3	Homme	23 ans	15,90
Echantillon 4	Homme	20 ans	16,46
Echantillon 5	Homme	50 ans	12,82
Echantillon 6	Femme	28 ans	15,35
Echantillon 7	Homme	47 ans	10,21
Echantillon 8	Homme	49 ans	13,37
Echantillon 9	Homme	20ans	11,71
Echantillon 10	Homme	42 ans	10,76
Echantillon 11	Homme	40 ans	15,03
Echantillon 12	Femme	21 ans	12,97
Echantillon 13	Homme	27 ans	17,56
Echantillon 14	Homme	38 ans	9,18
Echantillon 15	Homme	34 ans	14,24
Echantillon 16	Homme	42 ans	12,58
Echantillon 17	Homme	30 ans	15,35
Echantillon 18	Femme	22 ans	16,22
Echantillon 19	Homme	19 ans	16,14
Echantillon 20	Homme	32 ans	16,30

3.2. Caractéristiques de notre population

3.2.1. Répartition des individus de références selon l'âge

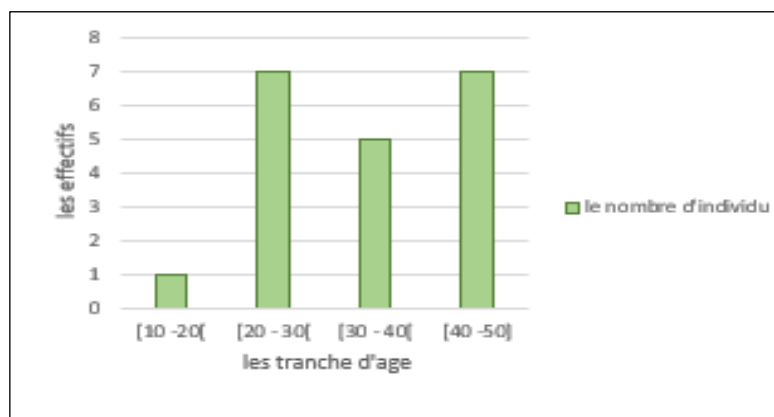


Figure 31 : Répartition des individus de référence selon l'âge.



- **Interprétation de graphe**

L'âge moyen était de 31.1 avec des extrêmes d'âge de 19 ans et 50 ans.

3.2.2. Répartition des individus de référence selon le sexe :

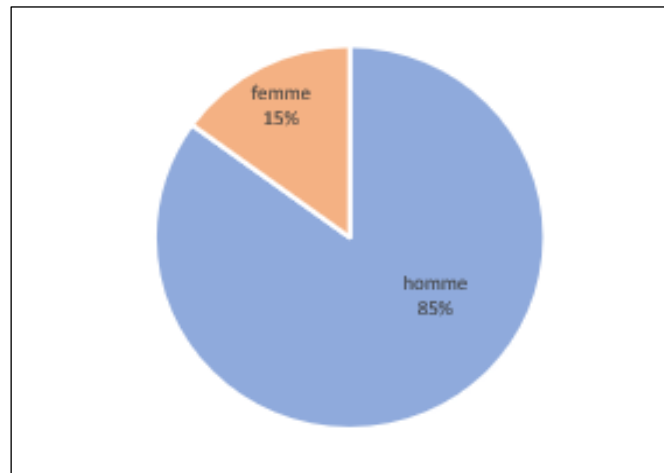


Figure 32 : Répartition des individus de référence selon le sexe.

- **Interprétation de graphe**

Notre groupe d'étude comporte :

- ✓ 17 hommes ce qui correspond à un pourcentage de 85% ;
- ✓ 3 femmes ce qui correspond à un pourcentage de 15%.

3.2.3. Répartition des patients selon la nature de résultats de test Elisa

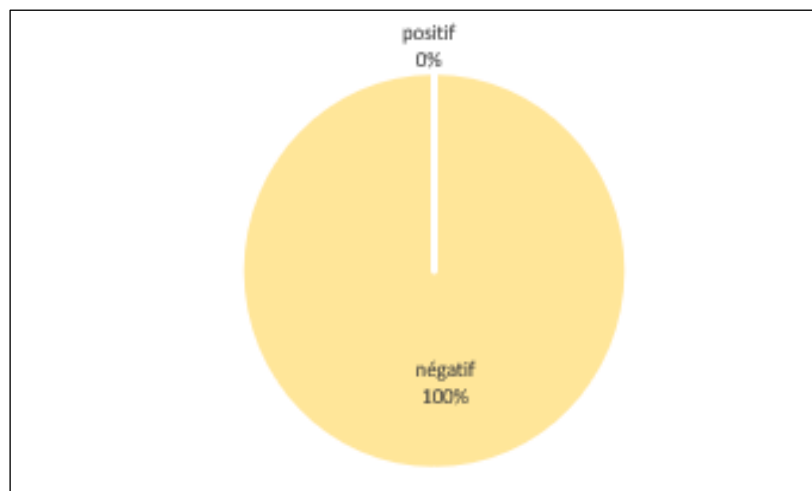


Figure 33 : Répartition des individus de référence selon la nature de résultat.



- **Interprétation de graphe**

Pour notre groupe d'étude qui est composé de 20 individus de référence, aucun résultat n'était supérieur à 20UE/ml, ce qui correspond à un pourcentage de **100 %** de résultat négatif.

3.3. Dispersion des valeurs de références sur notre population de référence

Après analyse des 20 échantillons d'individus de références par la technique ELISA screening et calcul de leur concentration en AAN, les résultats obtenues sont traités par un outil statistique de type Excel.

Par la suite nous avons opté à une représentation graphique de type boîte à moustache pour résumer la dispersion de notre série statistique ; et qui nous a donné en plus l'avantage de vérifier l'homogénéité de cette série et de déceler la présence d'éventuelles valeurs aberrantes (atypiques).

Tableau33 : représentation tabulaire des principales données statistique de notre Population de référence

Valeur Minimale	9,18
Valeur Maximale	17,56
Quartile 1 (Q1)	12,36
Médiane (Me)	14,40
Quartile 3 (Q3)	15,96
Intervalle interquartile (INQ)	3,59
Nombre de prélèvements	20
Valeurs aberrantes	Aucune

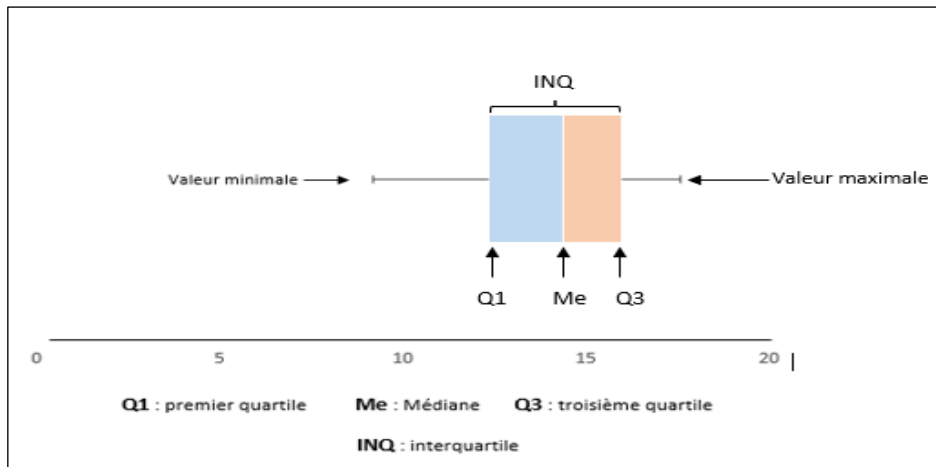


Figure 34 : boîte à moustache qui représente la répartition de nos 20 individus de références.

- **Interprétation de graphe**

- D'après ce graphe, on remarque que l'écart interquartile (Q3-Q1) possède une valeur faible ce qui nous permet de déduire que cette série statistique est homogène.
- Les bornes de l'intervalle qui nous permet de vérifier l'existence des valeurs aberrantes ont été calculées par ces deux formules :

$$\text{Borne inférieure} = Q1 - 1.5 * \text{INQ}$$

$$\text{Borne supérieure} = Q3 + 1.5 * \text{INQ}$$

- Les valeurs qui se situent en dehors de cet intervalle calculé sont considérés comme valeurs aberrantes.
 - Aucune valeur aberrante n'a été trouvée ; l'homogénéité de notre population est vérifiée.

3.4. Validation de l'intervalle de référence

La valeur 20UE/ml est une limite établie par Inova Diagnostic et utilisée par le laboratoire pour classer les sujets en positifs ou négatifs en AAN.

Après analyse des 20 échantillons de références, aucune valeur ne dépasse cette limite originelle.

La valeur de référence seuil proposée (20UE/ml) est donc considérée comme acceptable pour la population locale.



DISSCUSSION



1 -Analyse des résultats

1.1- La fidélité

La fidélité (précision) de la technique ELISA est définie sur la base de la reproductibilité des résultats au sein d'un test et entre plusieurs tests. Cette caractéristique est extrêmement importante pour s'assurer que les résultats obtenus au cours d'une étude sont fiables et reproductibles d'une expérience à l'autre.

Le mode d'expression de la fidélité (à 2 niveaux : répétabilité et fidélité intermédiaire) se fait par un outil de dispersion relative qui est le coefficient de variation CV% (selon la norme ISO 5725-2) qui permet de quantifier la variabilité entre les répliques intra ou inter-essais.

Le CV calculé est comparé au CV limite admissible, préalablement choisi (Fournisseurs, sociétés savantes, ...) [136].

Pour évaluer la fiabilité globale de vos résultats, le CV % inter-essais doit être inférieur à 15% tandis que le CV % intra-essais doit être inférieur à 10% [137,138] ; le procédé est d'autant plus fidèle que le CV est moindre et donc la partie aléatoire des erreurs expérimentales qui affectent les résultats est faible.

1.1.1- Technique ELISA appliquée au dépistage des AAN

- **Répétabilité (précision intra-essai)**

Le test a présenté une répétabilité très satisfaisante, les valeurs de CV obtenues sont inférieures à 10 % avec un CV moyen de 7,15%.

- **Fidélité intermédiaire (précision inter-essai)**

Le test a présenté une fidélité intermédiaire très satisfaisante, les valeurs de CV obtenues sont inférieures à 15 % avec un CV moyen de 7,58%.

Les résultats obtenus sont en accord avec les normes du Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry publié par FDA [137] et celle suggérée par le fournisseur ENZO [138] ; ce qui nous permet de confirmer une bonne répétabilité (précision intra-essai) et fidélité intermédiaire (précision inter-essai) de la technique ELISA appliquée au dépistage des AAN.

Le tableau ci-dessous présente les CV moyens de notre étude en comparaison avec ceux d'une étude faite et présentée par la fiche technique du réactifs Inova Diagnostics (Annexe 2).



Tableau 34 : Comparaison des CV moyens de la répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenus par notre étude avec ceux de Inova Diagnostics dans le cadre de l'évaluation de la technique ELISA appliquée au dépistage des AAN.

	Etude Inova Diagnostics	Notre étude
Répétabilité	6,60%	7,14%
Fidélité intermédiaire	10,2%	7,59%

1.1.2- Technique ELISA appliquée au Dosage des Ac anti ADN db

- **Répétabilité (précision intra-essai)**

Le test a présenté une répétabilité très satisfaisante, les valeurs de CV obtenues sont inférieures à 10 % avec un CV moyen de 4,92%.

- **Fidélité intermédiaire (précision inter-essai)**

Le test a présenté une fidélité intermédiaire très satisfaisante, les valeurs de CV obtenues sont inférieures à 15 % avec un CV moyen de 10,11%.

- ❖ Les résultats obtenus sont en accord avec les normes Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry publié par FDA [137] et celle suggérée par le fournisseur ENZO [138] ; ce qui nous permet de confirmer une bonne répétabilité (précision intra-essai) et fidélité intermédiaire (précision inter-essai) de la technique ELISA appliquée au dosage des Ac anti ADN db.

Le tableau ci-dessous présente les CV moyen de notre étude en comparaison avec celui d'une étude faite et présentée dans le catalogue de réactifs Inova Diagnostics (Annexe 3).

Tableau 35 : Comparaison des CV moyens de la répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenus par notre étude à ceux de Inova Diagnostics dans le cadre de l'évaluation de la technique ELISA appliquée au Dosage des Ac anti ADN db.

	Etude Inova Diagnostics	Notre étude
Répétabilité	5,6 %	4,92 %
Fidélité intermédiaire	9,1 %	12,47 %



1.1.3- Technique ELISA appliquée à l'identification des Ac anti-antigènes solubles

- **Répétabilité (précision intra-essai)**

Les coefficients de variation CV des différentes spécificités sont majoritairement inférieurs à 10% avec un CV moyen de 6,10%, exception faite pour la spécificité JO1 CV= 15,97% dont la valeur est supérieure à 15%.

La variabilité intra-essais de la spécificité JO1 peut s'expliquer soit par le manque de précision des appareils de mesures utilisés, chose qui est écartée à cause de la très bonne répétabilité des différentes spécificités, soit par des erreurs du manipulateur ou bien un problème de sensibilisation des puits de la plaque par les antigènes JO1 [139].

- **Fidélité intermédiaire (précision inter-essai)**

Les coefficients de variation CV des différentes spécificités sont majoritairement inférieurs à 15% avec un CV moyen de 11,03%, exception faite pour la spécificité SSB CV= 15,11% dont la valeur est supérieure à 15%.

La variabilité inter-essai de la spécificité SSB qui ne dépasse que légèrement les normes, peut s'expliquer par des erreurs de manipulations.

La majorité des résultats obtenus sont en accord avec les normes du Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry publié par FDA [137] et celle suggérée par le fournisseur ENZO [138] ; ce qui nous permet de confirmer la bonne répétabilité (précision intra-essai) et fidélité intermédiaire (précision inter-essai) de la technique ELISA appliquée à l'identification des Ac anti-antigènes solubles

Le tableau ci-dessous présente les CV moyen de notre étude en comparaison avec celui d'une étude faite et présentée par le catalogue de réactifs Inova Diagnostics (Annexe 4).

Tableau 36 : Comparaison des CV moyen de la répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenus par notre étude à ceux de Inova Diagnostics dans le cadre de l'évaluation de la technique ELISA appliquée à l'identification des Ac anti-antigènes solubles.

	Répétabilité		Fidélité intermédiaire	
	Etude Inova Diagnostics	Notre étude	Etude Inova Diagnostics	Notre étude
SSA	1,8	4,35	6,43	11,25
SSB	5,9	1,04	15,83	14,22
SM	3,8	3,38	9,03	12,45
RNP/SM	3	5,96	7,10	13,34
SCL70	2,9	5,92	8,27	13,70
JO1	2,6	15,97	10,63	9,53

1.2- La spécificité

La spécificité vise à évaluer la capacité de la méthode soumise à validation à ne pas donner de réponse positive quand la cible concernée n'est pas présente.

1.2.1- Technique ELISA appliquée au dépistage des AAN

Une étude a été menée par Lepers et al [140], a donné des résultats de la spécificité varie entre 69 et 90%.

Une deuxième étude a été faite par Amigues et al [141] sur un ensemble de sujets présentant la maladie de SHARP dont la spécificité ainsi obtenue varie entre 65,5% et 86,2%.

Ces résultats ainsi obtenus concordent avec ceux de notre étude faite sur 36 échantillons jugés sains ne présentant pas de connectivites, notre technique a détecté 33 échantillons négatifs, 2 échantillons positifs et un seul échantillon douteux ; soit une spécificité de 91,67%.

1.2.2- Technique ELISA appliquée au Dosage des Ac anti ADN db

Une étude a été faite par J. Martin et al [142], sur 30 échantillons de sujets lupiques, la spécificité varie entre 86,3 % et 96,1 %.

Une deuxième étude a été faite en Tunisie [143], sur 128 sujets lupiques la spécificité a été de l'ordre de 76%.



Ces résultats ainsi obtenus concordent avec ceux de notre étude faite sur 36 échantillons jugés sains ne présentant pas de connectivites, notre technique a détecté 34 échantillons négatifs, 2 échantillons douteux ; soit une spécificité de 94,40%.

1.3- Vérification et validation d'une valeur de référence

Cette étude porte sur la valeur de référence de la technique ELISA screening utilisée comme outil diagnostique dans l'exploration immunologique des connectivites.

Pour des difficultés rencontrées lors de l'application du protocole de base d'établissement des valeurs de références tel que recommande les différents organismes internationaux, ce travail a été consacré à la vérification d'une valeur de référence qui est égale à 20UE/ ml, proposée par le fournisseur et utilisée au niveau du laboratoire de biochimie de Tizi Ouzou, en vue d'une interprétation plus fiable des résultats de test ELISA dépistage.

Notre série d'étude comporte 20 individus de références tel que recommandent l'IFCC-LM et CLSI. Les sujets ont été choisis selon des critères d'inclusion et d'exclusion établis auparavant grâce à un questionnaire.

D'après nos résultats, on note une valeur basse de l'intervalle inter quartile qui est de l'ordre de 3.59, ce qui nous mène à confirmer l'homogénéité de notre série statistique.

A partir des valeurs de la borne inférieure et de la borne supérieure, on constate l'absence des valeurs aberrantes dans notre série d'étude, ceci nous laisse à confirmer l'homogénéité de notre groupe d'étude.

Sur les 20 échantillons d'individus de références, aucune valeur ne dépasse la limite de 20UE/ml (avec une valeur maximale observée de 17.56 UE/ml).

On peut conclure que la valeur seuil proposée par le fournisseur, utilisée par notre laboratoire et qui est de l'ordre de 20UE/ml est acceptable pour notre population, donc elle peut être prise comme valeur de référence locale.

1.4- Comparaison IFI/ HEp-2 Vs ELISA

Pour montrer l'utilité de la technique ELISA comme outil de diagnostic dans l'exploration immunologique des connectivites, plusieurs études comparatives avec la technique IFI sur cellules HEp-2 (GOLD-STANDARD) ont été faites.

On se propose dans ce présent travail de rassembler un ensemble de plusieurs études menées dans ce sens, on peut citer :



1- Une étude comparative a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie du centre hospitalo-universitaire de Tizi Ouzou pour révéler la place de la technique ELISA dans le dépistage des AAN [144].

Pour ce faire, 158 échantillons envoyés au laboratoire pour la recherche des AAN ont été utilisés dans cette étude et analysés par les 2 techniques de dépistage : IFI et ELISA. Voici les différents résultats obtenus :

- **Concordance entre l'IFI et l'ELISA :**

- ✓ Une concordance de 81% entre l'IFI et ELISA dans le screening des AAN a été notée.

- **Sensibilité et spécificité de l'ELISA :**

- ✓ La sensibilité = 60%, la spécificité = 86%.

2- L'étude faite par Kumar et al entre avril 2012 et septembre 2013 sur 294 échantillons dont 113 (38.4%) ont été obtenus de patients de sexe masculin et 181 (61.6%) de patients de sexe féminin, dont 274 (93.1%) provenaient des patients ayant 10 à 59 ans [145].

Ces échantillons ont été testés pour la détection des AAN par les méthodes IFI sur cellules HEp-2 et ELISA, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 37 : tableau de contingence 2*2 qui exprime les Résultats de détection des AAN par ELISA en prenant l'IFI comme GOLD- STANDARD. [145]

ELISA	IIF (Gold standard)	
	Positive	Negative
Positive	49	1
Negative	58	186
Total	107	187

Prenant la technique IFI comme GOLD-STANDARD, on note 107 patients positifs et 187 patients négatifs en AAN [145].

La Technique ELISA a détecté 50 sujets vrais positifs sur 107 sujets positifs, et 186 sujets vrais négatifs sur 187 sujets classés comme négatifs par technique IFI ce qui nous mène vers une



bonne spécificité de 99.5% mais une sensibilité faible de la technique ELISA qui est de 45,8% [145].

Ses résultats sont comparables à ceux d'une autre étude similaire faite à Bangladesh qui a révélé une faible sensibilité de 55% avec ELISA, par rapport à IFI sur cellules HEp-2 pour la détection des AAN dans les cas de LED chez l'enfant [146].

Alors que leur comparaison avec une troisième étude comparative entre l'IFI HEp-2 et cinq différents kits commerciaux d'ANA-ELISA a montré une sensibilité qui diffère largement d'un kit à l'autre variant entre 69,5% à 97.7% et une spécificité variante entre 81,4% à 97,9% [147]. Donc la spécificité obtenue dans cette dernière étude est comparable avec celle trouvée dans l'étude de Kumer et al, alors que ce n'est pas le cas pour la sensibilité. Cette différence est peut-être due à l'utilisation de kits importés qui ont donné des niveaux de concentration élevés pour différencier un échantillon positif et négatif. Une autre explication plus probable, cela est peut-être dû au nombre limité d'antigènes utilisés dans l'ELISA qui peuvent ne pas refléter les auto-anticorps du modèle de la population locale. Il peut également y avoir des différences raciales et / ou ethniques dans les profils d'auto-anticorps trouvés dans différents groupes de population [148].

De même, les VPP et VPN pour ELISA étaient respectivement de 98% et 76.2% dans l'étude de Kumer et Al, des résultats comparables avec ceux obtenus dans l'étude de Bengladesh qui a montré une VPP et VPN de 100% et 69% respectivement. [145, 146]

Donc ils ont tiré comme conclusion à la fin de cette étude que la méthode ELISA est une méthode approuvée, efficace et comparable à l'IFI sur cellules HEp-2 offrant d'autres avantages. Grâce à cette méthode, le dosage des AAN peut être effectué avec un plus grand nombre d'échantillons en un temps plus court et à un coût beaucoup plus faible [145].

3- Une étude similaire de EMLÉN & O'NEILL (1997) comparative entre l'IFI HEp-2 et 6 différents kits commerciaux d'ANA-ELISA a montré une spécificité qui diffère largement d'un kit à l'autre variant entre 54% à 96% [149].

4- Une étude faite en 1999, intitulé Tests de dépistage des anticorps antinucléaires (AAN) : utilisation sélective des antigènes nucléaires centraux comme base rationnelle pour le dépistage par ELISA, une comparaison entre une technique IFI sur cellules HEp-2 et une technique ELISA pour la détection des AAN. Des sérums envoyés à ce laboratoire pour le



dépistage des AAN ont été inclus dans la présente étude, choisis aléatoirement et testés dans l'ordre de leur réception. Voici les résultats obtenus :

Tableau 38 : tableau de contingence pour la Comparaison des méthodes de criblage AAN [150].

		ANA ELISA	
		Positif	Négatif
Cellules IIF HEp-2	Positif	110	13
	Négatif	27	471

$P < 0,0001$.

Pour 123 sujets classés comme positifs par la technique IFI sur cellules HEp-2, 110 parmi eux sont classés comme vrais positives par ELISA. Et pour 498 détectés comme négatifs par IFI, 471 sont classés comme des vrais négatifs. Donc la sensibilité de la technique ELISA est de 89% et sa spécificité est de 95%.

Corrélation hautement significative ($P < 0,0001$) entre le criblage ANA par IIF en utilisant des cellules HEp-2 comme substrat, contre L'utilisation d'ANA ELISA. Il s'agit d'une corrélation étonnamment forte [150].

5- Dans une autre étude récente (2008-2009), les performances du test ELISA ont été comparées au test IFI-ANA sur cellules HEp-2 « gold standard ». L'accord selon lequel un sérum est positif pour l'AAN était de 87% à 95% lors de la comparaison des résultats des tests ELISA et IFI-ANA. La sensibilité de l'ELISA était de 69% à 98% et la spécificité variait entre 81% et 98%. Ces chiffres ont été obtenus en utilisant des sérums positifs à 1 : 160 par le test IFI-ANA. Les chiffres de comparaison ci-dessus étaient beaucoup plus faibles pour les sérums avec un titre IFI-ANA de 1 :40. [151]

Ils ont pris comme conclusion dans cette étude que : bien que la deuxième étude multicentrique européenne ait montré que les méthodes ELISA s'améliorent, la récente étude de Bizzaro et al suggère que le problème des résultats faussement positifs en ELISA est toujours répandu. L'ELISA peut manquer l'anti-SSA / Ro même lors de l'utilisation des sérums de référence. Ceci est probablement due aux méthodes de préparation des antigènes



vigoureuses. Il a également été constaté que les techniques ELISA peuvent manquer un AAN positif à faible titre ainsi que des sérums avec un AAN spécifique. Actuellement, les tests ELISA peuvent être adéquats pour dépister les sérums uniquement avec des titres intermédiaires à élevés [151].

Une autre étude a été faite par des chercheurs en France, dans le cadre d'une évaluation d'une technique ELISA appliquée à la détection des anticorps anti-ADN natif en utilisant 408 patients (134 atteints de lupus, 74 d'une autre connectivite et 200 ne présentant pas de maladie auto-immune rhumatismale). La technique ELISA s'est révélée reproductible, une sensibilité de 94% pour la détection des ADN natif, une bonne spécificité qui est égale à 96%, une utilisation simple, rapide, et accessible à tous les laboratoires. La technique ELISA évaluée apparaît fiable en vue du dépistage et du suivi des anticorps anti-ADN natif des patients atteints de lupus érythémateux disséminé [152].

Tableau 39 : Résultats de différentes études faites sur la sensibilité et spécificité de l'ELISA.

L'étude	La sensibilité	La spécificité
Etude du laboratoire de biochimie CHU TO	60%	86%
Etude de Kumar et al	45,8%	99,5%
Etude d'EMLÉN & O'NEILL	-	45%-96%
Etude de ELI Olaussen et Ole Petter Rekving	89%	95%
Etude de Yashwant Kumar, Alka et Ranja Walker Minz	69%-98%	81%-98%
Etude de So Laplanche	94%	96%

On remarque que les valeurs de la spécificité de la technique ELISA obtenues ont été élevées et dépassent les 85% pour toutes les études effectuées, cependant il n'y avait pas une grande concordance entre les valeurs de la sensibilité : les valeurs obtenues par les deux premières études ont été faible de l'ordre de 45,8% et 60%, alors que dans les 03 autres études les valeurs dépassant les 80%.



On constate que la technique ELISA est très performante tant du point de vue de sa spécificité que de sa sensibilité, ce qui permet de dire qu'elle est une méthode approuvée, efficace et comparable à l'IFI sur cellules HEp-2 et peut être utilisée comme outil de diagnostic immunologique des connectivites.

De plus, la technique offre d'autres avantages le fait qu'elle est simple, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse, présente une lecture moins fastidieuse et plus objective et se porte facilement aux dosages en série de nombreux échantillons.

Néanmoins, la technique d'immunofluorescence indirecte sur cellules HEp-2 (IFI) reste la méthode de premier choix pour la détection des auto-anticorps car elle est très sensible en dépit de sa faible spécificité et la fluorescence observée lors de l'essai offre une grande valeur pour l'orientation diagnostique.

2- Biais et contraintes de l'étude

- L'étude de la fidélité de la technique ELISA appliquée à l'identification des anticorps anti-antigènes soluble ENA-6 a été limitée à un nombre restreint d'échantillons et de répétitions pour la raison de manque de réactifs.
- Les fiches de renseignements ont été remplies d'informations fournies par les sujets sélectionnés. Ceci constitue un biais dans la mesure où certains critères d'exclusion ne sont pas maîtrisables, notamment la prise de médicaments, prise d'alcool...
- Absence d'examen clinique antérieur aux prélèvements, ce qui pose une certaine incertitude sur l'état physiologique.
- Notre groupe d'étude contient 3 femmes et 17 hommes, cela est due aux difficultés de trouver des femmes remplissant les critères d'inclusion et exemptes des critères d'exclusion.
- Difficulté de maîtriser les conditions d'acheminements des prélèvements.
- L'intervalle d'âge de notre groupe d'étude est de 19 à 50 ans. A défaut du lieu de prélèvement, qui est le centre de transfusion sanguin dans lequel l'âge des donneurs oscille généralement entre 19 et 50 ans en général.



**CONCLUSION
ET
RECOMMANDATIONS**

Les connectivites sont un ensemble de maladies auto-immunes qui se caractérisent par une hétérogénéité clinique et biologique extrême. Elles sont caractérisées par un marqueur immunologique, qui est les anticorps anti nucléaires, élément de base dans l’exploration immunologique de ces maladies.

Afin de poser un diagnostic avec exactitude, il est recommandé de s’assurer de la crédibilité des résultats fournis par les différentes techniques utilisées lors de l’exploration, à savoir l’ELISA.

La recherche des AAN se réalise au niveau de laboratoire de biochimie de centre hospitalo-universitaire de Tizi Ouzou Nedir Mohamed par la technique ANA-ELISA suivi en cas de positivité par une étape d’identification des Ac anti-ADN db par la technique DNA-ELISA et/ou une identification des Ac anti Ag nucléaires solubles par la technique ENA-ELISA.

La présente étude a permis de mettre en évidence les différents niveaux de performances de la technique ELISA appliqué à l’exploration immunologique des connectivites. Ce travail permet notamment d’approuver la capacité de l’ELISA à donner des résultats répétables, ce qui ouvre accès à un suivi aisé des malades. Après analyse des résultats, l’ELISA utilisée au laboratoire de biochimie du CHU de Tizi-Ouzou présente une bonne spécificité ainsi qu’une bonne fidélité.

Nos résultats mettent ainsi l’accent sur l’aptitude de la technique à donner des résultats spécifiques, en d’autres termes l’ELISA permet de minimiser le nombre de faux positifs.

Malgré que l’IFI sur cellules HEp-2 soit considérée comme technique de référence, L’ELISA peut à son tour être utilisée comme une technique alternative de recherche d’AAN à grande échelle.

La valeur de référence de la technique ELISA utilisée pour le dépistage des anticorps antinucléaires au sein du laboratoire de Biochimie a aussi été validée au cours de ce travail.

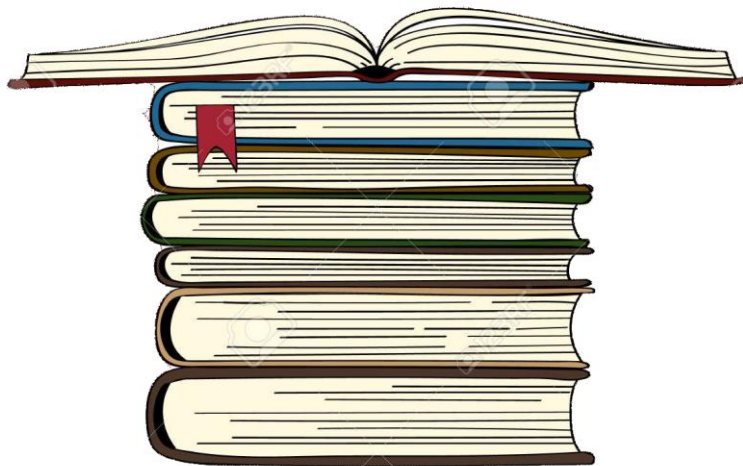
Ces résultats viennent appuyer ceux de nombreuses autres études, consolidant ainsi les connaissances sur la valeur diagnostic, pronostic et suivi des maladies auto immunes par les auto-anticorps anti nucléaires, et apportant ainsi de nouvelles preuves sur la fiabilité des bilans fournis par l’ELISA.

A l'issue de cette étude nous recommandons :

- ✓ Une association IFI-ELISA (mettre en évidence différents aspects orientant vers les diverses cibles possibles) ou autre technique afin d'améliorer l'interprétation des résultats.
- ✓ Un élargissement de panel de détection de cible antigénique est aussi recommandé et une augmentation du nombre d'Ag fixés ce qui va améliorer de la sensibilité de cette technique.
- ✓ Des validations de valeurs de référence des techniques ELISA utilisées pour l'identification des cibles antigéniques d'auto-anticorps doivent être faites pour vérifier la crédibilité de la norme utilisée au sein de la population locale.

Enfin, ce modeste travail aspire à attirer l'attention du personnel biologique analyste sur l'importance de la technique ELISA, en espérant que cette étude soit poursuivie et complétée par d'autres recherches, à plus grande échelle, afin d'affiner les résultats trouvés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





1. Chantal André, et al. Mécanismes physiopathologiques de l'auto-immunité. 2012.
2. Marie Christine Béné, Jean-Daniel Lelièvre, and J. Sibia. Immun pathologie, ed. E. MASSON. 2015 : Association des Collèges des enseignants d'immunologie des universités de langue française (ASSIM).
3. Mouthon, L. (2018). Épidémiologie, classification des connectivites. JMV-Journal de Médecine Vasculaire, 43(2), 74. doi:10.1016/j.jdmv.2017.12.004
4. Philippe Dieudé, Estibaliz Lazaro, and C. Richez. Physiopathologie du lupus érythémateux, in lupus érythémateux. 2013.
5. Pollard, K.M. Autoantibodies and Autoimmunity-Molecular Mechanisms in Health and Disease. 2006 : Wiley-VCH. 608.
6. Orphanet avec la collaboration de Pr Zahir Amoura. Lupus érythémateux systémique. Encyclopédie Orphanet Grand Public. www.orpha.net. Juillet 2008 p1.
7. Pr Zahir AMOURA. Lupus systémique. PROTOCLE NATIONAL DE DIAGNOSTIC ET DE SOIN (PNDS), janvier 2017 et mise à jour janvier 2019. P8.
8. le lupus en 100 questions pour mieux gérer la maladie, Dernière mise à jour : 30-12-2010.
9. Buxeraud, J. Le lupus érythémateux systémique. Actualités Pharmaceutiques, 55(560), 45–47. doi:10.1016/j.actpha.2016.09.010.
10. MUNOZ LE et al. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Lupus, 2008 ; 17 : 371-375.
11. O. Meyer. Lupus érythémateux systémique. Service de rhumatologie - hôpital Bichat 75018 Paris France.
12. Chauveau D. Atteinte des reins au cours du Lupus Erythémateux Systémique.
13. K. Lassoued a, V. Gouilleux-Gruart, P. Coppo b. Place des anticorps antinucléaires en pratique clinique ? Réanimation. 2005;(14) :651–656.
14. Lupus érythémateux systémique. Annales de Dermatologie et de Vénérologie. Elsevier Masson, éditeur. 2003 ; Vol. 130(N° SUP 10-).



15. Lupus érythémateux disséminé. The University of Vermont Medical Center. Dernière révision totale févr. 2018| Dernière modification du contenu février 2018. Le manuel MSD version pour les professionnels de santé.
16. Dr Jacqueline Rossant-Lumbroso, Dr Lyonel Rossant. Le lupus systémique (ou lupus érythémateux aigu disséminé, LEAD), Doctissimo-santé, 19 mars 2018.... Mis à jour le 17 décembre 2018.
17. Pouchot, J. (2000). Pronostic et qualité de vie dans le lupus érythémateux systémique. La Revue de Médecine Interne, 21, 457–460. doi:10.1016/s0248-8663(00)90018-3.
18. Drs AIKATERINI LIAPI, ALICE HORISBERGER, Pr FRANÇOIS SPERTINI et Dr CAMILLO RIBI, REVUE MÉDICALE SUISSE, WWW.REVMED.CH, 6 avril 2016 ; 12 : 698-702, P698.
19. BROSTOFF J., SCADDING G.K., MALE O.K. & ROITT LM., Immunologie Clinique. Belgique, De Bœck-Wesmael s.a., 1993.
20. S. VARACHE, V. DEVAUCHELLEPENSEC, S. JOUSSE-JOULIN, A. SARAUX, Repères pratiques Syndrome de Gougerot-Sjögren, Comment prendre en charge un syndrome de Gougerot-Sjögren en 2010 ? Revue Réalités en rhumatologie # 24_Mars 2010.
21. Martel, C., Jauberteau, M.-O., Vidal, E., & Fauchais, A.-L. (2014). Physiopathologie du syndrome de Gougerot-Sjögren primitif. La Revue de Médecine Interne, 35(8), 524–530. doi:10.1016/j.revmed.2013.12.011
22. A. Liapi, A. Horisberger, F. Spertini, C. Ribi. Syndrome de Sjögren. Revue Médicale Suisse. [En ligne]. 2016. 12 Disponible sur : <https://www.revmed.ch/RMS/2016/RMS-N-513/Syndromede-Sjoegren-quand-le-suspecter-et-comment-le-confirmer>.
23. Kaplan G, Mariette X. Maladies et syndromes systémiques : Syndrome de Gougerot-Sjögren. 4ème éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion ; 2000 : 53-73.
24. Pierre-Yves Hatron, GOUGEROT-SJÖGREN, Service de Médecine Interne, CHU Claude Huriez, Lille, société national française de médecine interne (juillet 2014).
25. Pr YANNICK ALLANORE, Pr LUC MOUTHON, Pr ZAHIR AMOURA, Pr ERIC HACHULLA, Dr VERONIQUE LE GUERN et Pr JEAN SILIBIA. Livre de sclérodémie systémique en 100 questions, le sixième de la collection <<100 questions pour mieux gérer la maladie >>. Edition maxima. Questions numéros 02, 11,12.
26. Dr MARIE VANTHUYNE et Dr BEATRICE André avec la participation de Pr Frédéric HOUSSIA. Livre de brochure d'information à l'usage des patients, publié par l'association des patients sclerodermiques de Belgique (APSB) N de dépôt D/2010/9601/12-ISBN-978-2-87512-05701, p16.
27. Pr ERIC HACHULLA et LUC MOUTHON. Protocole national de diagnostic et de soins PNDs 2017. Centre de référence des maladies auto immunes systémiques rares. Sclérodémie systémique. PP14,16.



28. Yannick Allanore. Physiopathologie de la sclérodémie systémique. Médecine/sciences 2016 ;32 : 183-91.
29. J.-P. Zuber, C. Chizzolini, A. Leimgruber, A. Bart, F. Spertini. Mécanismes pathogéniques de la sclérodémie et leurs conséquences thérapeutiques. 1ère partie : pathogénie. Revue Médicale Suisse. [Cité 12 avril 2019].
30. A. Leimgruber. Sclérodémie : nouveautés dans la prise en charge des patients - Revue Médicale Suisse [Internet]. [Cité 28 mai 2019].
31. PAUL LEGENDRE, LUC MOUTHON, université Paris Descartes, service médecine interne, hôpital Cochin, centre de référence maladies systémiques auto immunes rares, assistance public- hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, Juin 2015, publié par la société nationale française de médecine interne.
32. ORPHANET avec collaboration de Pr ERIC HACHULLA et l'association des sclérodermiques de France. La sclérodémie, sclérodémie systémique localisée. Encyclopédie ORPHANET grand public. www.ORPHANET.NET. P 9.
33. ORPHANET et édité avec le soutien de la CNSA, avec la collaboration de Pr ERIC HACHULLA, La sclérodémie, 12 Juin 2018, Encyclopédie ORPHANET du Handicap p 01.
34. C02 sclérodémie systémique, livre de poche de médecine vasculaire, valmi 2007. Réalisé par le Collège des Enseignants de Médecine Vasculaire, c02-1_c02-4, p3-4.
35. Pierre-André Guerne. Myosites : données actuelles sur la classification, le diagnostic et le traitement. Revue Médicale Suisse 2008; volume 4. 718-727 (RMS149).
36. S. Bernatsky, L. Joseph, CA Pineau, P Bélisle, JF Boivin, D Banerjee, AE Clarke. Estimation de la prévalence de la polymyosite et de la dermatomyosite à partir de données administratives : âge, sexe et différences régionales. BMJ journal annals of the Rheumatic diseases Volume 68, numéro 7.
37. G. Brinchault, V. Morel, S. Guillot, H. Léna, P. Delaval. Myopathies inflammatoires idiopathiques et atteintes pulmonaires. La Lettre du Pneumologue - Volume VI - no 6 - novembre-décembre 2003 page224.
38. Alana M. Nevares. Myosite auto-immune. MD, The University of Vermont Medical Center.
39. Kaddour, N., Frigui, M., Zayen, A., Akrouit, R., Marzouk, S., & Bahloul, Z. (2008). Les aspects cliniques et le pronostic des dermatomyosites et des polymyosites du Sud tunisien. La Revue de Médecine Interne, 29, S357.
40. Chérin P., & Marie, I. (2005). Les nouveaux critères diagnostiques et d'évaluation des polymyosites et dermatomyosites. La Revue de Médecine Interne, 26(5), 361–367. doi:10.1016/j.revmed.2005.02.002



41 .protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Dermatomyosite de l'enfant et de l'adulte, Centre de référence pour les maladies rhumatologique et inflammatoires rares pédiatriques, Centre de references des pathologies neuromusculaires, juillet 2016.p33

42. Morel, J., Miossec, P., & Combe, B. Immun pathologie de la polyarthrite rhumatoïde. EMC - Rhumatologie-Orthopédie, 1(3), 218–230. (2004).

43. Combe, B. Polyarthrite rhumatoïde : clinique et diagnostic. EMC - Appareil Locomoteur, 2(3), 1–15. (2007).

44. J. Morel, P. Miossec, B. Combe. Immun pathologie de la polyarthrite rhumatoïde, Unité Inserm U454 et service d'immuno- rhumatologie, hôpital Édouard Herriot, 5, place d'Arsonval,69437 Lyon cedex 03, France.

45. Sany J. La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. Ed John Libbey Eurotext, Paris,1999: p 283.

46. communication de Paul Emery et al, ACR/EULAR 2009.

47. Nicolas HUBERT, tutorat : Dr Bouvard, Rhumatologue, CHU d'ANGERS, La Polyarthrites Rhumatoïde : Suivi et Traitement, 15-06-2012, p19.

48. Pr ZAHIR AMOURA, Pr LAURENT ARNAUD. Connectivite mixte. Le portail des maladies rares et médicaments orphelins., ORPHANET, ORPHA :809, dernière mise à jour : octobre 2009. www.orpha.net .

49. Drs ETIENNE PERRIN, ANNETTE LEIMGRUBER, PIERRE-ALEXANDRE BART et Pr FRANCOIS SPERTINI. Connectivite mixte. Revue médicale suisse 2003, volume-1.22995 revemed.ch.

50. Branlant-Redon E. Syndrome de Sharp ou connectivité mixte. Description clinique, biologique, immun pathologique et approche thérapeutique : A propos de trois observations. 2009;141.

51. Sullivan W. D., Hurst D. J., Harmon C. E., Esther J. H., Agia G. A, Maltby J. D., et al. A prospective evaluation emphasizing pulmonary involvement in patients with mixed connective tissue disease. Medicine (Baltimore). 1984;63:92-107.

52. Sharp G. c., Irvin W. S., Tan E. M., Gould R G., Holman H. R. Mixed connective tissue disease--an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). Am J Med. 1972;52: 148-59.



53. E. Perrin, A. Leimgruber, F. Spertini, P.-A. Bart. Connectivite mixte : mise au point [Internet]. Revue Médicale Suisse. 2003 [cité 8 avril 2019].
54. Branlant-Redon Estelle. SYNDROME DE SHARP OU CONNECTIVITE MIXTE DESCRIPTION CLINIQUE, BIOLOGIQUE, IMMUNOPATHOLOGIQUE ET APPROCHE THERAPEUTIQUE. 2009 ;140.
55. ORPHANET avec collaboration de : Pr ZAHIR AMOURA. Connectivites mixtes. Encyclopédie orphanet grand public, www.orpha.net ,mars2009.
56. Estelle BRANLANT-REDON, SYNDROME DE SARP OU CONNECTIVITE MIXTE DESCRIPTION CLINIQUE, BIOLOGIQUE, IMMUNOPATHOIOGIQUE ET APPROCHE THERAPEUTIQUE, UNIVERSITE HENRI POINCARRE, NANCY 1 2009, Le 28 avril 2009, p35.
57. HUMBEL, R.L., histoire des anticorps antinucléaires. GEAI info 1999. N°2 : p. 1-2.
58. dictionnaire de l'Encyclopédie universalis France-universalis.fr-anticorps, anticorps monoclonaux.
59. J. Sibilia. Auto-anticorps : intérêt diagnostique et pronostic en réanimation médicale-réanimation 2002 ; 11 :349-58- 002. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS – p350.
60. B. Terrier, L. Mouthon – les auto-anticorps en pratique clinique- revue des maladies respiratoires vol 23, N 6-decembre 2006 p.743745- organe officiel de la société de pneumologie de langue Française-EM consulte.
61. Dr Bach-Nga PHAM, Clichy et Pr Jean-Louis PREUD'HOMIVIE. Auto-immunité et autoanticorps, hôpital Beaujon, CHU de Poitiers et sous l'égide de la société Française d'immunologie, institut Pasteur, Paris- cahier de formation n 13 février 1999.
62. Encyclopédie, chapitre 18, faculté de médecine Cochin-port royal. Responsable de l'enseignement B. Weill : auto-anticorps non spécifiques d'organes : anticorps anti-nucleaires.Ivts.fr
63. Pr. M. Xavier et Jean Sibilia. Ouvrage l'Immunopathologie Pour le Praticien, sous l'égide du CRI (Club Rhumatisme et Inflammation) chapitre 12, (3-21).
64. Hiepe, F., Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus, in autoantibodies and autoimmunity, K.M. Pollard, Editor. 2006. p. 247-266.
65. Arbuckle MR, et al., Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. Med, 2003. 349(1526-33)
66. Goetz and Nespola, Le dialogue clinico- biologique en auto-immunité. Bio Med 2015 (15:204-8.)



67. Benseffaj, N, Atouf, O., Ouadghiri, S., Brick, C., & Essakalli, M. (2012). Valeur diagnostique des auto-anticorps dans les maladies auto-immunes. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 27(5), 233–236.
68. Goetz, J., B. Nespola., and j. sibilja., Comment prescrire les auto-anticorps : des indications à la juste prescription *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES*, JUILLET/AOUT 2016(N°484).
69. Emile, C., Dosage des autoanticorps et interprétation. *Option Bio*, 2017(n565-566).
70. K. Lassoued, P. Coppo, and V. Gouilleux-Gruart, Place des anticorps antinucléaires en pratique clinique *Réanimation*, 2005. 14: p. 651–656.
71. Goulvestre. C, Anticorps antinucléaires. *Presse Med*, 2006. 35(287-95).
72. Riemekasten G, et al., A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Invest*, 1998. 102(754-63).
73. Mandy Sowa , Rico Hiemann , Peter Schierack , Dirk Reinhold , Karsten Conrad et Dirk Roggenbuck. Test d'auto-anticorps de nouvelle génération par combinaison de dépistage et de confirmation - la technologie CytoBead® *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017; 53 (1): 87-104. Publié en ligne le 2 juillet 2016 doi: 10.1007 / s12016-016-8574-3 (PMC)
74. SIBILIA, J. (2002). Auto-anticorps : intérêt diagnostique et pronostique en réanimation médicale *Auto-antibodies : help for diagnosis and prognosis in intensive care patients*. *Réanimation*, 11(5), 349–358. Doi :10.1016/s1624-0693(02)00255-4
75. S. Petitpierre, V. Aubert, A. Leimgruber, PA. Bart, F. Spertini. Utilité de la recherche des autoanticorps dans la pratique quotidienne. *Rev Med Suisse [En ligne]*2009; volume 5. Consultable sur : <https://www.revmed.ch/RMS/2009/RMS-199/Utilite-de-la-recherche-des-autoanticorps-dans-la-pratique-quotidienne>. (823-831).
76. Juliette Lasoudris Laloux. Nouvelle recommandation pour le dépistage des anticorps antinucléaire Meroni. - *Option Bio*-lundi 13 décembre 2010 N 446 source- source :PL. Schur PH. ANA Screening: an old test with New recommendations. *Ann RheumDis*.2010;69:1420-2.
77. Bahia el Azzouzi. Diagnostic immunologique des aspects cytoplasmiques à l'immunofluorescence indirecte- Thèse N° 94 PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 23 /04/2019 PAR Mlle. - Faculté de médecine et de pharmacie MARRACKECH.p32,34,35,31.



78. Joëlle GOETZ. Immunofluorescence indirect G E A I L' I N F O N u m é r o S p é c i a l M A I 2 0 0 5- page 2, 5,4.
79. M. Koumouvie, C. Paulin. LES AUTO-ANTICORPS (Liu et al, 2014).
80. M. KHELLAF - Auto-anticorps dans les maladies systémiques : quand les demander, comment les interpréter ? -Revue générale Médecine interne -p2.
81. Carole Emile. Stratégie de dépistage des anticorps anti-nucléaires (ANA). , d'après une communication de Stéphanie François, Focus N°28- Biomnis biologie médicale spécialisée. Modifiée.
82. Catherine JOHANET, Eric BALLOT. Techniques ELISA en auto-immunité- G E A I L' I N F O N u m é r o S p é c i a l M A I 2 0 0 5- page10,11.
83. Fiche technique du réactif Inova Diagnostics, QUANTA Lite ANA ELISA.
84. E, E. and P. P, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
85. Item 117 : Diagnostic des connectivites Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue française - © Université Médicale Virtuelle Francophone - 2010-2011.
86. AARDEN L.A. DE GROOT E.R., FELTKAMP T.E.W., Immunology of DNA. III. Crithidia luciliae, a simple substrate for the determination of ante-ds DNA with the Immunofluorescent technique. Anil. NY Acad. 5ci.1975 ; 254 : 505-15.
87. Carole Emile, Les anticorps anti-ADN, laboratoire Biomnis BIOLOGIE MEDICALE SPECIALISÉE Focus, N°4o, d'après une communication de Pascale Chrétien lors du 7e colloque GEAI, Paris, juin 2012.
88. PINCUS T., Immunochemical conditions affecting the measurement of DNA antibodies using ammonium sulfate precipitation. Arthrites Rheum.1971;14: 623-30.
89. Test de Farr, http://www.memobio.fr/html/immu/im_au_far.html
90. FORTENFANT, F. and S. DUBUCQUOI, Les radio-immun dosages ont-ils encore une place dans notre pratique quotidienne ? GEAI info, 2005. Numéro Special : p. 7.



91. PREUD'HOMME J.L., DANON F., ROCHARD E., GODET D., TOUCHARD G., AUCOUTURIER P., ALCALAY M., Détection des anticorps anti-ADN natif de classes IgG, IgA et IgM par ELISA, comparaison avec le test de Farr et l'immunofluorescence indirecte. Presse Med.1988 ;17 :1401-4.
92. PREUD'HOMME J.L., ROCHARD E., GODET E., DANON F., ALCALAY M., TOUCHARD G., AUCOUTURIER P., Isotypic distribution of ante-double stranded DNA antibodies. A diagnostic evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay. Diagn. Clin. Immuno. 1988 ; 5 :256-61, Février 1999, Dépôt légal mars 1999.
93. Béné, M.C., et al., Méthodes en immunologie -Des principes aux bonnes applications. 2014 : ELSEVIER Masson. 214.
94. Texte résumé du chapitre 31 du livre IMMUNOLOGIE par REVILLARD Avec la collaboration de l'Association des Enseignants d'Immunologie des Universités de Langue Française (ASSIM) - 4ème édition 2001- DeBoeck Université - ISBN2 - 8041 - 3805 - 4 Modifié par Marie-Paule Lefranc, avec l'autorisation du Professeur Jean-Pierre Revillard et de DeBoeck Université (Mai 2003).
95. Lafont, R. MÉTHODES PHYSIQUES DE SÉPARATION ET D'ANALYSE ET MÉTHODES DE DOSAGE DES BIOMOLÉCULES. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES ; Available from : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>.
96. N, W. and P. T, Flow cytometry: an "old" tool for novel applications in medical genetics. Clin Genet, 2001(1): p. 8.
97. DAA, V., Multiplexed particle-based flow cytometric assays. J Immunol Methods, 2000 (p : 243).
98. A. Cesbron-Gautier, P. Simon, L. Achard, S. Cury, G. Follea, J.-D. Bignon, Technologie Luminex : application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA, Annale Biologie Clinique, vol. 62, n° 1, janvier-février 2004
99. SH GTA 6
100. Mauge, L., Paul, J.-L., & Benoît, M.-O. (2010). Évaluation des performances analytiques d'une méthode Elisa pour le dosage du GDF-15 plasmatique. Immuno- Analyse & Biologie Spécialisée, 25(1), 56–61. Doi : 10.1016/j.immbio.2010.01.004
101. Dr Catherine Arnaud, EVALUATION DES PROCEDURES DE DEPISTAGE, - Faculté de Médecine de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil.



102. Albert Charpentier, évaluation des tests biologiques pour le diagnostic d'évènements coronariens aigus en médecine d'urgence, thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse, soutenue le lundi 27 septembre 2010.

103. Isabelle Durand-Zaleski Professeur de médecine Sylvie Bastuji-Garin Docteur Université Paris XII, Hôpital Henri-Mondor, AP-HP, Paris, Le dépistage des facteurs de risque biologiques comme outil d'aide à la décision, Médecine prédictive : mythe et réalité, adsp n° 34 mars 2001, p 28 et 29

104. Dr. Lahcène NEZZAL, PERFORMANCES D'UN TEST DIAGNOSTIQUE, UM Constantine, Septembre 2012.

105. Christine MÉDAILLE¹, QUALITÉS DIAGNOSTIQUES DES TESTS BIOLOGIQUES, Communication présentée le 17 mars 2011, 06_medaille_C2-Bastien 26/07/11 12 :25 Page137 au 142.

106. Guide de validation des méthodes d'analyses, L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail ANSES – Pôle Recherche et Référence, ANSES/PR3/07/01 version a Date : 28 octobre 2015.p : 24-24-41-42.

107. R.H. Jacobson. Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. Rev. SCI. Tech. Off. int. Epiz., 1998,17 (2), 487-506.

108. Michèle Désenfant, Marc Priel- Cédric Rivier. De la validation des méthodes d'analyse a l'évaluation de l'incertitude de mesure, laboratoire National d'essais BNM-LNE 1, rue Gaston Boissier 75724 Paris Cedex 15.

109. M.R. Nendaz, A. Perrier. Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test diagnostique, Mémentos biostatistique, Clinique de Médecine 1, Hôpitaux Universitaires de Genève, Suisse. Rev Mal Respir 2004 ; 21 : 390-3.

110. Samuel Degoul, Comment mesurer la performance d'un test diagnostique ? Présentation et comparaison d'indicateurs. THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE, Présentée et soutenue publiquement le 16 septembre 2016 à 18 heures, UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE 2 FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG.

111. VALIDATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE, Laboratoire de santé publique du Québec, PR-GQ-011 Version 04.



112. I. Guessous J. Cornuz J.-M. Gaspoz F. Paccaud, Dépistage : principes et méthodes, Rev Med Suisse 2010 ; 6 : 1390-4 Revue Médicale Suisse – www.revmed.ch – 14 juillet 2010.

113. PHILIPPE BOYER – Comprendre les tests diagnostiques, GAZETTE DE L'AFAR N°78 - JANVIER 2013.

114. Bousquet, P. J., Daures, J. P., & Demoly, P. (2005). Principes, caractéristiques et interprétation des tests de diagnostic et de dépistage. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, 45(4), 314–319. Doi: 10.1016/j.allerg.2005.02.019.

115. Saeed Safari,¹ Alireza Baratloo,¹ Mohamed Elfil,² and Ahmed Negida^{3,*} Evidence Based Emergency Medicine Part 2: Positive and negative predictive values of diagnostic tests Emerg (Tehran)v.3(3); Summer 2015PMC4608333.

116. Robert Trevethan. Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives : fondements, pliaibilités et pièges dans la recherche et la pratique Santé publique, 20 novembre 2017.

117. Ren Jie Robert Yao, Jason G Andrade, Marc W Deyell, Heather Jackson, Finlay A McAlister, Nathaniel MHawkins. Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives de l'identification de la fibrillation auriculaire à l'aide de données administratives : revue systématique et méta-analyse dovepress© Copyright 2020 • Dove Press Ltd.

118. Miodrag stojanovic, Mariia Andjelkovic Apostolovic, Dijana Stojanovic, Zoran Milosevic, Aleksandra Ignjatovic, Vesna Mitic Lakusic, Mladjan Golubovic Understanding Sensitivity, Specificity and Perfective Values ,2014 Nov;71 (11):1062-5.

119. Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative, RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES, Guide de validation – Contrôle qualité, Organisation Internationale de la vigne et du vin, 10/2005.

120. RÉPÉTABILITÉ & REPRODUCTIBILITÉ D'UNE MÉTHODE, Florent ARNAL, Université de Bordeaux, 2017.

121. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE, Document SH GTA 04Révision 01.



122. Joseph Henny- Concept de valeurs de référence, laboratoire du centre de médecine préventive, 2 avenue du Doyen Jacques Parisot, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy cedex France 16/05/07.

123. Anne Geffré A. Nouvelles approches de la production d'intervalles de référence de populations [Thèse], soutenue Le 1^{er} juillet 2011, Université Toulouse III ; 2011.

124. Njikeutchi FN. Contribution à l'établissement des valeurs de référence de paramètres biologiques chez le burkinabé : Evaluation de cinq constituants biochimiques [Thèse]. Ouagadougou : Centre Hospitalier National Yelgado Ouédraogo ; 2002-2003.

125. Henny J. Etablissement et validation des intervalles de référence au laboratoire de biologie médicale. Annales de biologie clinique. Vandœuvre-lès-Nancy ; 2011. N 69 (2) p. 229-37.

126. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun J-P. Reference values: a review. Vet Clin Pathol. sept 2009 ;38(3) :288-98.

127. Libbey J. Réviser le concept de valeurs de référence, une nécessité : Ann biol clin [En ligne]. Juil-Août 2001 [consulté le 02/03/2017] ; 59(4). Disponible sur <http://www.jle.com>

128. Henny J, Arnaud J, Giroud C, Vassault A et les membres du sous-groupe 2 analytique. Intervalles de référence : détermination et vérification., Annal de Biologie Clinique 2010 ; 68 (Hors-série no 1) : 305-313.

129. Dr Vanessa Decool. Etablissement des intervalles de référence au laboratoire d'analyses médicales, F.M.C Tourcoing. 15 décembre 2015.

130. CLSI A28 C2 Comment définir et déterminer la fréquence de référence dans le laboratoire clinique, Directive-deuxième édition approuvée, Vol. 20 No. 13, Vol-C28 remplace, A. 15 n°

131. Joseph Henny. L'interprétation d'un examen de biologie médicale : forces et limites du concept de « valeurs de référence », Journée des Académies nationales de médecine, pharmacie et de la Société française de biologie clinique, Académie de médecine, Paris, 24 janvier 2018.

132. Goetz., J., B. Nespola., and j. sibilis., Comment prescrire les auto-anticorps : des indications à la juste prescription REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES, 2016(N°484).



133. Emile, C., Dosage des autoanticorps et interprétation. Option Bio, 2017(n565-566).
134. Chevailler, A., LES CONNECTIVITES : LA PLACE DES ANTICORPS ANTINUCLIAIRES. Revue Francophone des Laboratoires, 2006 (N~384).
135. Dr Catherine Arnaud-EVALUATION DES PROCEDURES DE DEPISTAGE-
Deuxième Cycle des Etudes Médicales - Faculté de Médecine de Toulouse Purpan et Toulouse Rangueil-p 65.
136. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) /
VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE, Document SH
GTA 04Révision 01.
137. Guidance for industry- bioanalytical method validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
138. Brian Conrad, %CV in ELISA: How to Reduce Them and Why They're Important, January 2018, <https://www.enzolifesciences.com/>.
139. R.H. Jacobson, Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses, Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 1998,17 (2), 487-506.
140. Lepers, S., Hachulla, E., Leleux, E., Hatron, P, Prin, L., & Dubucquoi, S. (2002). Intérêt de la recherche des anticorps anti nucléosome par technique ELISA dans le diagnostic de la maladie lupique. Étude comparative de quatre coffrets commerciaux. Pathologie Biologie, 50(10), 584–590.
141. Amigues I. M., Cantagrel A, Abbal M., Mazieres B. Comparative study of 4 diagnosis criteria sets for mixed connective tissue disease in patients with anti-RNP antibodies. Autoimmunity Group of the Hospitals of Toulouse. J Rheumatol. 1996;23:2055-62.
48. van den Hoogen F. H., Spronk P. E., Boerbooms A M., Bootsma H., de Rooij D. 1.
142. Martin, J., Durant, C., Rimbart, M., Hemont, C., Hamidou, M., & Audrain, M. (2012). Evaluation of two antibodies against double-stranded DNA assays in discriminating between active and non-active systemic lupus erythematosus: Correlation between the cut-off and the specificity. Pathologie Biologie, 60(6), 387–391.



143. Ghedira, I., Sakly, W., & Jeddi, M. (2002). Caractéristiques cliniques et sérologiques du lupus érythémateux systémique : à propos de 128 cas. *Pathologie Biologie*, 50(1).
144. Place de la technique ELISA dans le diagnostic immunologique des connectivites, TOUDERT.A, DAHMANI.D, 8^{èmes} journées nationales de pharmacie, 06 & 07 Novembre 2019, CHU de Tizi Ouzou.
145. G.L.S. Sumanth Kumar, Abhijit Chaudhury, Anju Verma, Usha Kalawat, B.V. Ramana, B. Siddhartha Kumar Comparison of enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) with indirect immunofluorescence for detection of anti-nuclear antibody: 10.15380/2277-5706.JCSR.14.056
146. Dipti TR, Azam MS, Sattar MH, Rahman SA. Detection of anti-nuclear antibody by immunofluorescence assay and enzyme immunoassay in childhood systemic lupus erythematosus: experience from Bangladesh. *IntJ Rheum Dis* 2012; 15:121-5.
147. Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, MouritsenCL, Litwin CM, Hill HR. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. *Am J ClinPathol* 1996; 105:468-73
148. Pisetsky DS. Antinuclear antibodies in healthy people: the tip of autoimmunity's iceberg? *Arthritis Res Ther* 2011,13 :109.
149. OODRUFF EMLN and LAURIE O'NEILL, Comparison of Detection with Immunofluorescence and Enzyme-linked Immunosorbent assays; *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 40, No. 9, September 1997, pp 1612-1618. 1997, American College of Rheumatology.
150. Eli Olaussen 1 et Ole Petter Rekvig 1,2, Tests de dépistage des anticorps antinucléaires (ANA): utilisation sélective des antigènes nucléaires centraux comme base rationnelle pour le dépistage par ELISA, Article n ° jaut.1999.0295, disponible en ligne sur <http://www.idealibrary.com> sur *Journal of Autoimmunity* (1999) 13, 95–102.
151. Yashwant Kumar, Alka Bhatia et Ranjana Walker Minz, Anticorps antinucléaires et leurs méthodes de détection dans le diagnostic des maladies du tissu conjonctif : un voyage revisité, *Pathologie diagnostique* 2009, 4 : 1, Reçu : 21 octobre 2008 Accepté : 2 janvier 2009, Publication : 2 janvier 2009, BIO MED Central.
152. So Laplanche 1, N. Abuaf 2, B. Absalon 2, M.C. Diemert 1, L. Musset 1 et J. Galli 1, Evaluation d'une technique immuno-enzymatique de type ELISA pour la detection des anticorps anti-ADN natif, *ImrnunoanaL BioL Spdc.* (1989) 17, 59-64, © Elsevier, Paris.

ANNEXES

Critères d'Exclusion :

Etat de santé	Oui	Non
Etes-vous atteint(e) d'une connectivite ?		
Présentez-vous des signes cliniques en relation avec une connectivite ? (douleurs articulaires, photosensibilité....)		
Souffrez-vous d'une maladie auto-immune ? (Diabète de type 1, thyroïdite...)		
Sortez-vous d'une infection ? ou êtes-vous encore atteint de cette même infection ?		
Souffrez-vous d'une maladie inflammatoire chronique ?		
Êtes-vous atteint(e) d'un cancer ?		
Prenez-vous un médicament (délais de 1 mois) ? Si oui, veuillez le mentionner.....		
Avez-vous des antécédents familiaux ? (de connectivite ou autre maladie auto-immune)		

Autres	Oui	Non
Prise d'alcool		
Tabagisme		
Traumatisme physique ou psychique		

Pour les femmes	Oui	Non
Grossesse		
Prise de contraception orale		

ANNEXE II

Fiche technique du réactif Inova Diagnostics, QUANTA Lite ANA ELISA.

QUANTA Lite® ANA ELISA

Uniquement pour "Diagnostics In-Vitro"

Complexité de CLIA: Haut



REF 708750

Rx Only

Application

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

Informations concernant le test

La présence d'ANA est un des marqueurs des maladies systémiques.^{1,4} Les ANA sont dépistés par IFI en utilisant comme substrat³ les coupes de rein-estomac de souris ou de rat ou sur HEP-2. A l'issue de cette étape, les sérums ANA positifs peuvent être typés en utilisant une technique ELISA, Western blot ou d'Immunoprécipitation.^{1,4}

Récemment, un mélange d'antigènes à valeur diagnostique extraits des cellules HEP-2 a été utilisé en technique ELISA pour détecter les ANA.⁵⁻⁹ Les avantages de la technique ELISA par rapport à la technique d'IFI incluent la facilité d'utilisation, des résultats standardisés (sans variations dues ni à l'observateur ni à l'équipement) et semi-quantitatifs et la technique ELISA réduit le risque de résultats faussement positifs. Les inconvénients de la technique ELISA par rapport à la technique IFI sont par contre le manque de sensibilité vis-à-vis des antigènes nucléaires et cytoplasmiques à ce jour non identifiés d'une part et le manque de possibilité d'observation des patterns qui font le succès de la technique IFI d'autre part. Cependant, l'utilité diagnostique d'un ANA de spécificité inconnue n'est pas claire aujourd'hui dans la mesure où de nombreuses personnes non malades sont ANA positives mais ne comportent pas d'ANA de valeur diagnostique importante.¹⁰⁻¹² De plus, une fois qu'une réactivité spécifique est identifiée dans un sérum, le pattern ne présente alors plus de valeur diagnostique. C'est pourquoi, la technique ELISA a une place utile en laboratoire pour la détection des ANA.

Principe du test

Des antigènes extraits de cellules HEP-2 séparément puis hautement purifiés par affinité sont fixés sur les puits d'une plaque de microtitration en polystyrène dans des conditions qui préservent leur état natif. Ces antigènes sont : les nucléosomes (ADNdb et histones), Sm/RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, centromère, PCNA, Jo-1, Mitochondrie M2 et Ribosome P. Il a été montré récemment que la réactivité anti-nucléosomes est un marqueur sensible et précoce des LED¹³. Les contrôles pré-dilués et les sérums de dilués patients sont ajoutés dans différents puits. Une étape d'incubation permet la liaison entre les anticorps anti-ANA présents dans le sérum et l'antigène immobilisé dans le puits. Les molécules non liées aux antigènes sont éliminées par lavage. Un conjugué enzymatique anti-IgG humaine est alors ajouté dans chaque puits pour révéler les autoanticorps du patient. Après une étape d'incubation, le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'activité enzymatique résiduelle est quantifiée grâce à l'addition d'un substrat chromogène suivie d'une étape de mesure de l'intensité de la coloration ainsi développée. Les résultats peuvent être évalués par comparaison entre la couleur du puits échantillon et celle des puits de contrôle.

Contenu du coffret

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

Avertissements

1. ATTENTION: Le diluant des échantillons, les contrôles et le conjugué contiennent 0,02% de chloramphénicol, considéré comme cancérigène dans l'état de Californie.
2. Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'Hépatite B et anti-Virus de l'Hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, de VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.¹⁴

3. L'azide de sodium (NaN₃) est utilisé comme conservateur. NaN₃ est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.
4. Le conjugué Peroxydase HRP contient un composant chimique dilué qui est un poison corrosif, toxique en cas d'ingestion en grande quantité. Pour éviter des brûlures chimiques, il est recommandé d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux.
5. Le chromogène TMB est irritant et peut être toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et d'absorption en grande quantité. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux et toute inhalation.
6. La solution d'arrêt HRP est une solution diluée d'acide sulfurique. Éviter de l'exposer aux bases, aux métaux, aux oxydants ou tout autre composé susceptible de réagir avec les acides. L'acide sulfurique est toxique et corrosif en cas d'absorption. Éviter le contact avec la peau et les yeux pour éviter toute brûlure chimique.
7. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.
8. Les solvateurs de réactifs doivent être nettoyés immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

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

Conditions de conservation

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

Echantillons

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

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

Procédure

Matériel fourni

- 1 Plaque microtitration ELISA ANA (12-1 x 8 puits), avec support
- 1 1,2 ml Contrôle ELISA Négatif pré-dilué
- 1 1,2 ml Contrôle ELISA faiblement positif ANA pré-dilué
- 1 1,2 ml Contrôle ELISA fortement positif ANA pré-dilué
- 1 50 ml diluant HRP pour échantillons
- 1 20 ml tampon de lavage HRP concentré 40X
- 1 10 ml conjugué HS-HRP IgG humaines de chèvre
- 1 10 ml substrat TMB
- 1 10 ml solution d'arrêt HRP (acide sulfurique 0,344M)

Autre matériel nécessaire non fourni

- Pipettes 5, 100, 200-300 et 500 µl
- Cônes jetables
- Tubes de 4ml pour la dilution de sérum
- Eau distillée ou déionisée
- Réceptif de 1 litre pour le tampon de lavage HRP dilué
- Lecteur ELISA avec filtre de 450nm (et 620nm pour les lectures à double longueur d'ondes)

Méthode

Préparation du test

1. Porter tous les réactifs et échantillons à la température ambiante (20-26°C) et bien les mélanger avant de les utiliser.
 2. Diluer la totalité de la solution de lavage (25ml) avec 975 ml d'eau distillée (1/40). La solution de tampon diluée reste stable une semaine à 2-8°C. Si la totalité de la plaque de microtitration n'est pas utilisée en une seule fois, un plus petit volume de tampon sera suffisant, par exemple pour traiter 16 puits, diluer 2ml de tampon concentré dans 78ml d'eau distillée.
 3. Préparer les sérums des patients en les diluant au 1/41 dans le diluant échantillon ANA HRP (10µl dans 400µl). Ne pas diluer les contrôles ELISA fortement positif, faiblement positif en ANA et négatif. Les sérums ainsi préparés doivent être utilisés dans les 8 heures qui suivent leur dilution.
- NOTE : Les échantillons dilués au 1/41 dans le diluant échantillon ANA HRP peuvent aussi dans un second temps, être déposés directement ainsi préparés sur des puits HEp-2 pour confirmer la positivité ANA et déterminer le pattern. Par contre, pour tirer les échantillons positifs sur HEp-2 utiliser le tampon PBS standard de dilution des échantillons. En effet, des dilutions autres que le 1/41 n'ont pas été évaluées dans le diluant échantillon ANA HRP.**
4. La détermination de la présence ou de l'absence de l'ANA en unités arbitraires nécessitent deux puits pour chacun des trois contrôles et un ou deux puits pour chacun des sérums de patients. Il est recommandé de tester les échantillons en double.

Exécution du test

1. **PORTER TOUS LES REACTIFS ET LES ECHANTILLONS A TEMPERATURE AMBIANTE (20-26°C) AVANT DE LES UTILISER.** Placer le nombre nécessaire de micro puits ou de barrettes sur le portoir. Remettre immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le dessiccant, fermer hermétiquement pour éviter toute condensation de vapeur d'eau.
2. Distribuer 100 µl de chacun des contrôles ELISA fortement, faiblement positifs en ANA et négatif pré-dilués et de sérums des dilués patients dans les puits. Recouvrir les barrettes et laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Le temps d'incubation commence après l'ajout du dernier échantillon.
3. Lavage: aspirer le contenu de tous les puits. Recouvrir les barrettes et laisser incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Répéter cette opération deux fois supplémentaires pour un total de trois lavages. Après le dernier lavage, retourner la plaque en la tapotant sur du papier absorbant, pour enlever tout liquide de lavage résiduel. Pour l'aspiration, maintenir la même séquence que celle utilisée lors de la distribution des échantillons. Distribuer 100 µl de conjugué HS-HRP IgG dans chaque puits. Le conjugué doit être prélevé du flacon dans des conditions aseptiques. Éviter en une seule fois la quantité de conjugué nécessaire à la réalisation de la série.
4. **NE PAS UTILISER LE FLACON. NE JAMAIS REMETTRE LE RESTE DU CONJUGUE AMBIANT DANS LE FLACON.** Recouvrir les barrettes et incuber pendant 30 minutes à température ambiante comme décrit à l'étape 2.
5. Lavage: Répéter la procédure décrite à l'étape 3.
6. Distribuer 100 µl de chromogène TMB dans chaque puits et laisser incuber à l'obscurité 30 minutes à température ambiante.
7. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt HRP dans chaque puits. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du chromogène TMB. Tapoter délicatement les puits.
8. Lire la densité optique (DO) de chaque puits à 450nm dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction. Pour une lecture bichromatique, la longueur d'onde de référence peut être 620nm.

Contrôle de qualité

1. Les contrôles ELISA fortement positif ANA, faiblement positif en ANA et négatif doivent être inclus à chaque série de tests afin de s'assurer du bon fonctionnement des réactifs et du bon déroulement de la procédure. Etant donné que les contrôles ELISA fortement positifs ANA, ELISA faiblement positifs en ANA et négatifs sont pré-dilués, il n'est pas possible de valider le procédé de dilution des échantillons.
3. Des contrôles de qualité supplémentaires peuvent être réalisés selon les directives nationales, les réglementations internationales ou celles des organismes d'accréditation. Des contrôles appropriés peuvent être obtenus en ajoutant un pool de sérums humains conservé à une température inférieure ou égale à -20°C. Pour valider les résultats obtenus, tous les critères décrits ci-dessous devront être vérifiés. Si un ou plusieurs de ces critères ne sont pas réalisés, le test devra être considéré comme non valide et à refaire.
 - a. Les contrôles du Contrôle ELISA fortement positif en ANA pré-dilué doit être supérieure à celle du contrôle ELISA faiblement positif en ANA pré-dilué. D'autre part, la densité optique du contrôle ELISA faiblement positif en ANA doit être inférieure à celle du contrôle ELISA négatif pré-dilué.
 - b. La densité optique du contrôle ELISA fortement positif en ANA pré-dilué doit être supérieure à 1,0. Celle du contrôle négatif pré-dilué doit être inférieure à 0,15.
 - c. L'absorbance du Contrôle ELISA faiblement positif en ANA doit être deux fois supérieure à celle du contrôle négatif d'ELISA ou supérieure à 0,15.
 - d. Les contrôles ELISA négatif et ELISA fortement positif en ANA permettent de contrôler le bon fonctionnement des tests. Le Contrôle ELISA fortement positif en ANA assure pas la précision de la valeur seuil du test.
 - e. L'utilisateur du test peut se référer au document C24-A du NCCLS pour des informations supplémentaires concernant le contrôle qualité.

Calcul des résultats

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

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

Valeur de l'échantillon = _____ DO de l'échantillon
(unités) DO du contrôle faible
x valeur du contrôle faible
(unités)

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

Interprétation des résultats

Le test ELISA est une technique très sensible et peut en conséquence détecter de très faibles différences au sein d'un groupe de patients. Les valeurs limites détaillées dans le paragraphe "calcul des résultats" sont indicatives. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs seuils d'interprétation en fonction de ses techniques, contrôles, équipements et populations de patients.

Les échantillons peuvent être interprétés comme négatifs, modérément ou fortement positif selon les valeurs en unités détaillées ci-dessous :

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

- Un résultat positif indique la présence d'anticorps ANA et la possibilité des connectivités comme le Lupus Erythémateux Disséminé (LED), le Syndrome de Sjogren, la sclérodémie et les connectivités mixtes.
- Un résultat négatif indique l'absence d'anticorps anti-ANA ou bien un taux d'anticorps en dessous de la valeur seuil.
- Nous suggérons de rendre les résultats avec la remarque suivante: "Les résultats suivants ont été obtenus avec le test ELISA Inova QUANTA Lite ANA. Les valeurs d'anti-ANA obtenues avec des tests de différents fabricants ne sont pas interchangeables. Le taux d'anti-IgG trouvé n'est pas corrélé à une titration en point final."

Limites du test

- La présence de Complexes Immuns ou d'autres agrégats d'immunoglobulines dans le sérum humain peut entraîner l'augmentation d'une liaison non spécifique et des résultats faussement positifs.
- Tous les patients atteints de connectivités ne sont pas nécessairement ANA positifs.
- Les résultats obtenus à l'aide de ce test devront être corrélés avec les signes cliniques et d'autres tests sérologiques.
- La spécificité d'un sérum positif ne peut pas être déterminée à l'aide de ce test. Il est recommandé d'utiliser d'autres tests pour déterminer la spécificité.
- Les sérum de contrôle de ce coffret sont RNP positifs. Cet antigène est l'un des plus sensibles à la dégradation. De ce fait, ces contrôles permettent une mesure sensible de l'intégrité de l'antigène. D'autres contrôles peuvent être utilisés en plus pour suivre le niveau des différents antigènes selon le choix du laboratoire.
- Les performances du coffret pour les échantillons autres que les sérum n'ont pas été établies.

Performances

Valeur normale

La valeur seuil entre un sérum négatif et un sérum positif est de 20 unités. 246 sérum de donneurs volontaires sains ont été utilisés pour évaluer la spécificité du coffret QUANTA Lite ANA ELISA. Cette population de 246 était constituée de 65% de femmes dans une tranche d'âge de 18 à 75 ans pour une moyenne de 38 ans. 23 (soit 9,4%) ont été rendus positifs, conduisant ainsi à une spécificité du coffret à 90,6%. Cependant, 6 de ces 23 échantillons positifs ont aussi été rendus positifs sur cellules HEP-2 par la technique d'IFI. Si l'on ne tient pas compte de ces 6 patients, seulement 6,9% de la population a montré des résultats biologiquement faussement positifs. Ces sérum faussement positifs ont montré des valeurs de 35 unités maximum. Environ 60% du panel testé a montré des valeurs inférieures à 10 unités.

Sensibilité et spécificité relatives

Comparaison avec un coffret commercial de référence ANA ELISA

Des échantillons définis en termes cliniques ont été testés par Inova QUANTA Lite ANA ELISA et une référence ANA ELISA. Les résultats pour la population en bonne santé et ceux des patients atteints de SLE, du syndrome de Sjogren et de la sclérodémie sont repris dans le tableau ci-dessous. Par ailleurs, les sérum contenant des anticorps réactifs à SSA, SSB, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1, chromatine, ribosomique P et M2 par ELISA furent testés. Des échantillons positifs par immunofluorescence ou immunoblot pour le centromère, la colline P-80, les nucléoles et PCNA furent également testés. Les kits ont donné des résultats presque identiques. Tel que calculés dans les tableaux ci-dessous, la sensibilité relative est de 89 % et la spécificité relative est de 89 %.

Comparaison sur une population saine du coffret Inova avec un coffret ANA ELISA de référence :

Normaux n=134	Négatifs	Inova ANA ELISA	Positifs
Référence ANA ELISA	Positifs	Négatifs	Positifs
		106	6**
		13*	9***

* La valeur de ces échantillons variant de 1 à 1,6 unités dans le coffret ELISA de référence et de 20 à 33 unités dans le coffret QUANTA Lite ANA ELISA en évaluation. 4 de ces échantillons ont aussi été rendus ANA Positifs sur HEP-2 en IFI.

** Ces sérum ont donné des valeurs de 20 à 25 unités sur le coffret QUANTA Lite ANA ELISA. 2 d'entre eux ont aussi été positifs sur HEP-2.

*** 3 de ces sérum furent aussi rendus ANA positifs sur HEP-2.

Comparaison sur une population atteinte de maladies systémiques rhumatoïdes du coffret Inova avec un coffret ANA ELISA de référence :

SRD n=100	Négatifs	Inova ANA ELISA	Positifs
Référence ANA ELISA	Positifs	Négatifs	Positifs
	4*	6	1
	89	89	89

* L'un de ces échantillons a été rendu négatif par IFI sur cellules HEP-2.

Comparaison sur une population de réactivités biologiques connues du coffret Inova avec un coffret ANA ELISA de référence :

Définit n=74	Négatifs	Inova ANA ELISA	Positifs
Référence ANA ELISA	Positifs	Négatifs	Positifs
	2**	1**	7***
	64	64	64

** Parmi ces 2 sérum, l'un était PCNA, l'autre Scl-70, les 2 étant positifs en IFI sur cellules HEP-2.

*** Cet échantillon a été rendu positif sur HEP-2 avec un pattern nucléaire.

Ces échantillons se répartissent ainsi : 1 Scl-70, 1 RNP, 1 M2, et 4 Jo-1, tous faiblement à modérément positifs sur QUANTA Lite ANA ELISA. Les sérum Scl-70 et RNP sont aussi ANA positifs en IFI sur cellules HEP-2, les autres négatifs mais faiblement positifs sur le cytoplasme des HEP-2.

Comparaison entre le coffret QUANTA Lite ANA ELISA et la technique IFI sur NOVA Lite HEP-2

Tous les sérum normaux et les échantillons cliniquement définis ont aussi été testés en parallèle sur les cellules HEP-2 Inova. Pour éviter toute variation dans les résultats, la lecture en IFI a été faite en aveugle. Les résultats obtenus sont rassemblés dans les 2 tableaux ci-dessous. Dans la population normale de nombreux sérum ont été rendus négatifs en ELISA par rapport à la technique IFI. Dans le second tableau, le test ELISA est presque aussi sensible que la technique IFI sur cellules HEP-2 pour la détection des ANA chez les patients lupiques, atteints du syndrome de Sjogren et de Sclérodémie.

Comparaison sur une population saine du coffret QUANTA Lite ANA ELISA avec un coffret NOVA Lite HEP-2 :

Population normale n=134	Négatifs	Inova ANA ELISA	Positifs
IFI sur cellules HEP-2	Positifs	Négatifs	Positifs
	28	91	10*
	5	5	5

* Tous ces échantillons ont donné des valeurs inférieures ou égales à 35 Unités.

Comparaison sur une population atteinte de maladies systémiques rhumatoïdes du coffret ANA ELISA avec un coffret NOVA Lite™ HEP-2 :

MSR n=100	Négatifs	Inova ANA ELISA	Positifs
IFI sur cellules HEP-2	Positifs	Négatifs	Positifs
	1	9*	3**
	87	87	87

* 3 échantillons concernent des patients atteints de LED, Syndrome de Sjogren et de sclérodémie. La plupart ont montré de faibles intensités ANA.

** Ces échantillons sont tous issus de patients atteints de LED. L'un d'entre eux a montré un signal cytoplasmique fortement positif et a été rendu ribosome P en ELISA.

Comparaison des tampons pour la détection des ANA par IFI sur cellules HEP-2

Il est probable que certains laboratoires utiliseront le coffret QUANTA Lite ANA ELISA pour dépister les échantillons négatifs et typer les échantillons positifs avec la méthode traditionnelle d'IFI sur HEP-2. Pour rendre cette démarche plus facile, le diluant échantillon ANA est compatible avec les techniques traditionnelles d'IFI.

Des échantillons testés pour la recherche d'ANA par IFI sur cellules HEP-2 Inova ont aussi été testés sur HEP-2 en les diluant dans le tampon de dilution ANA du coffret QUANTA Lite ANA ELISA à la place du PBS fourni dans le coffret NOVA Lite HEP-2. Les résultats obtenus ont été identiques entre les 2 diluants pour les patients LED, Syndrome de Sjogren et sclérodémiques ; seulement 5 des 97 échantillons ont été discordants. Le diluant échantillon ANA diminue le bruit de fond et a permis 3 fois une interprétation positive d'échantillons rendus antérieurement négatifs, ceci grâce à une diminution du bruit de fond cytoplasmique qui a laissé de ce fait apparaître un pattern ANA. Sur 2 autres échantillons, ce diluant a permis de rendre négatifs des sérum rendus antérieurement faiblement positifs en diminuant le marquage nucléaire. Comme attendu, il y a plus eu de discordances sur le panel de sérum normaux, car des signaux négatifs ou faiblement positifs en IFI sont plus difficiles à déceler que des résultats fortement positifs. En utilisant le diluant PBS, 33% de sérum sains ont été positifs alors que seulement 26% l'ont été avec le diluant ANA ELISA. La littérature récente rapporte un taux d'ANA positifs de 30% dans la population normale en utilisant un taux de dilution au 1/40 (11). Le titre de 4 sérum positifs a été déterminé par dilution sériée dans le diluant PBS à partir de la dilution au 1/41 dans le diluant ANA ELISA. Tous ont montré un titre d'une dilution supérieure par rapport à une dilution initiale dans le tampon PBS classique. Les dilutions des sérum autres que au 1/41 dans le diluant échantillon ANA n'ont pas été étudiées.

Sensibilité et spécificité clinique

Groupe de patients	Total	QUANTA Lite ANA +	
		Nombre	(%)
Donneurs sains	246	23	9%
Patients cliniquement définis			
LED	46	43	93%
Syndrome Sjogren	27	24	89%
Sclérodemie	27	23	85%
Antigènes typés*	74	71	96%

* Entre 4 et 9 sérums connus pour être positifs pour SS-A, SS-B, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1, Nucléosomes, Ribosome P et M2 ont été testés. Ont aussi été testés des sérums positifs en IFI ou par technique Western blot pour les centromères, P-80 coilin, nucléoles et PCNA. Sur la base des résultats décrits ci-dessus, la sensibilité clinique du coffret QUANTA Lite ANA ELISA pour le LED est de 93% et sa spécificité clinique de 91%. Le pourcentage d'échantillons ANA positifs dans la population atteinte de LED est en accord avec les données de la littérature^{1,4}. Il faut noter que quelques uns de ces patients étaient en cours de traitement corticostéroïdes au moment des prélèvements pour cette évaluation. Les patients atteints du Syndrome de Sjogren et de Sclérodemie étaient connus pour être ANA positifs par la technique d'IFI. Il est intéressant de noter que le nombre d'échantillons faussement positifs dans la population saine a été significativement inférieur à celui observé sur cellules HEP-2 en IFI, qui est en général reporté entre 20 et 30% (voir tableau suivant)^{11,12}.

Précision

Intra- essais

Afin d'évaluer la précision en cours de l'expérience QUANTA Lite ANA ELISA, chacun des 5 échantillons a été testé 12 fois sur une plaque ELISA. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5
Moyenne	31U	51U	54U	144U	172U
DS	1,3	3,4	6,0	9,6	6,5
CV	4 %	7 %	11 %	7 %	4 %

Inter-essais

Pour évaluer la précision entre les expériences, 4 échantillons positifs et 1 hautement négatif furent testés une fois par jour, pendant 6 jours. Results are tabulated below.

	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5
Moyenne	16U	27U	31U	47U	160U
DS	1,6	2,4	2,2	5,1	22,6
CV	10 %	9 %	7 %	11 %	14 %

QUANTA Lite, Inova et Inova Diagnostics sont des marques d'Inova Diagnostics, Inc. © 2015 Inova Diagnostics, Inc. Tous droits réservés.

ANNEXE III

Fiche technique du réactif Inova Diagnostics, QUANTA Lite dsDNA SC ELISA.

QUANTA Lite® dsDNA SC ELISA

Uniquement pour "Diagnostics *In-Vitro*"
Complexité de CLIA: Haut



REF 704650

Application

Ce coffret permet de quantifier *in vitro* les autoanticorps IgG spécifiques dirigés contre l'acide désoxyribonucléique double brin (ADN db) dans le sérum humain. Il apporte une aide au diagnostic du lupus érythémateux disséminé (LED) en conjonction avec d'autres résultats cliniques.

Le matériel fourni est suffisant pour tester au maximum 40 échantillons en double ou 88 échantillons en simple avec une courbe de calibration, un contrôle positif, un contrôle négatif et un contrôle ADN simple brin.

Informations concernant le test

Les autoanticorps anti-ADN reconnaissent l'ADN simple brin (sb) ou l'ADN double brin (db). Les autoanticorps anti-ADN simple brin ne sont pas spécifiques de maladies et sont associés avec de nombreuses conditions autoimmunes comprenant : le LED induit par des médicaments, les maladies des tissus connectifs mixtes, l'arthrite rhumatoïde, les sclérodermies et le syndrome de Sjögren.

Par contre, les autoanticorps anti-ADN db sont associés de façon plus spécifique au LED^{1,2,3}, où la formation de complexes immuns joue un rôle majeur dans la pathogénèse de la maladie. Les dépôts de complexes immuns induisent une inflammation et des caractéristiques rénales et vasculaires de la maladie.⁴

Une augmentation soudaine de l'activité de la maladie LED est généralement précédée d'une augmentation des taux d'anticorps anti-ADN db, suivie par une forte augmentation à l'apogée de la maladie.⁵ Cette observation confirme la nécessité de suivre régulièrement les taux d'autoanticorps anti-ADN db chez des patients atteints de LED.

Principe du test

Les micropuits sont recouverts de l'antigène ADN db de thymus de veau. Les calibrateurs, les contrôles et les échantillons dilués sont déposés dans les puits permettant ainsi la liaison spécifique de l'anticorps à l'ADN db fixé. Après avoir rincé les puits pour éliminer toute trace de protéines non accrochées, un anticorps de chèvre anti IgG humaines purifié et conjugué à la peroxydase est déposé. Au cours de l'incubation, le conjugué enzymatique se lie aux IgG ayant reconnu l'ADN db. L'excès de conjugué marqué non accroché est éliminé par des lavages. Le conjugué accroché est visualisé en utilisant du 3,3',5,5' tétraméthyl benzidine (TMB). En présence de peroxydase, on obtient une coloration bleue qui vire au jaune après l'ajout d'une solution d'arrêt. L'intensité de la couleur produite dépend de la concentration dans l'échantillon d'IgG spécifiques de l'antigène. L'acide sulfurique est ajouté à chaque puits pour arrêter la réaction. Le produit final induit est coloré en jaune et la densité optique est lue à 450nm.

Contenu du coffret

1. Plaque ELISA de micropuits en polystyrène sécables coatés avec l'ADN db de thymus de veau., avec portoir de 12 barrettes de 8 micropuits en polystyrène sécables, dans un sachet d'aluminium avec un dessiccant
2. Contrôle Négatif ELISA pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain sans anticorps humains anti-ADN db, dans du tampon avec du stabilisateur
3. Calibrateur A ELISA ADN db SC pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains ADN db, dans du tampon avec du stabilisateur
4. Calibrateur B ELISA ADN db SC pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains ADN db, dans du tampon avec du stabilisateur
5. Calibrateur C ELISA ADN db SC pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains ADN db, dans du tampon avec du stabilisateur
6. Calibrateur D ELISA ADN db SC pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains ADN db, dans du tampon avec du stabilisateur
7. Calibrateur E ELISA ADN db SC pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains ADN db dans du tampon avec du stabilisateur
8. Contrôle positif ADN db SC pré-dilué, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains ADN db, dans du tampon avec du stabilisateur
9. Diluant d'échantillons type III, teinté en jaune, 2 flacons de 50 ml contenant du tampon, du Tween 20, des stabilisateurs de protéines et des conservateurs
10. Tampon de lavage HRP concentré 40X – tampon Tris salin avec du Tween 20, teinté de rouge, 1 flacon de 25 ml. Consulter le paragraphe "Méthode" pour la dilution.
11. Contrôle ADN sb SC, 1 flacon de 1,2 ml de sérum humain avec des anticorps humains ADN sb, dans du tampon avec du stabilisateur
12. Conjugué ADN db IgG, humaines, dans du tampon avec des stabilisateurs de protéines et des conservateurs, teinté en bleu, 1 flacon de 10 ml
13. TMB Chromogène, avec stabilisateurs, 1 flacon de 10 ml
14. Solution d'arrêt HRP, acide sulfurique 0,344M, non teinté, 1 flacon de 10 ml

Avertissements

1. ATTENTION: Le des échantillons, diluant, les contrôles et le conjugué contiennent 0,02% de chloramphénicol, considéré comme cancérigène dans l'état de Californie. Le diluant d'échantillons contenez Proclin 150. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux et toute inhalation.

2. Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation des contrôles a été testé et trouvé négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'hépatite B et anti-Virus de l'hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, de VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux.
3. L'azide de sodium (NaN₃) est utilisé comme conservateur. NaN₃ est un poison et il est toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. Éviter de l'exposer aux bases, métaux ou autres composants, réagissant avec les acides. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.
4. Le conjugué Peroxydase HRP contient un composant chimique dilué qui est un poison corrosif, toxique en cas d'ingestion en grande quantité. Pour éviter des brûlures chimiques, il est recommandé d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux.
5. Le chromogène TMB est irritant et peut être toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et d'absorption en grande quantité. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux et toute inhalation.
6. La solution d'arrêt HRP est une solution diluée d'acide sulfurique. Éviter de l'exposer aux bases, aux métaux, aux oxydants ou tout autre composé susceptible de réagir avec les acides. L'acide sulfurique est toxique et corrosif en cas d'absorption. Éviter le contact avec la peau et les yeux pour éviter toute brûlure chimique.
7. Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.
8. Les éclaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

1. Ce test est pour un usage diagnostic *in vitro*.
2. Ce réactif doit être utilisé par un personnel formé.
3. Il est recommandé de suivre scrupuleusement le protocole. Toute déviation peut affecter les performances et les résultats obtenus. Lire attentivement les « Notes » et les « Avertissements ».
4. Les réactifs des coffrets ayant des numéros de lots différents ne sont pas interchangeables. Si de grandes séries de tests doivent être réalisées, vérifier que tous les réactifs aient le même numéro de lot. Toutes les barrettes utilisées doivent être issues du même sachet aluminium. La substitution de certains réactifs peut induire des résultats incorrects.
5. Afin d'éviter la contamination des réactifs, utiliser uniquement de nouveaux récipients ou des récipients propres en verre ou en plastique. Ne jamais remettre les réactifs non utilisés dans leur flacon d'origine.
6. S'assurer que le tampon de lavage soit dilué dans un récipient propre. Si le tampon présente tout signe de contamination bactérienne ou un trouble, il doit être éliminé et une solution fraîche préparée.
7. Ne pas laisser les réactifs sans bouchon ; l'évaporation ou la contamination des réactifs peut induire des résultats incorrects.
8. Le substrat TMB ne doit pas être exposé à la lumière ou mis en contact avec de l'eau.
9. Les échantillons hémolysés, lipidiques, contaminés par des bactéries ou contenant des particules de matières ne doivent pas être utilisés.
10. L'utilisation de pipettes calibrées et de contrôles de qualité internes est recommandée.
11. L'utilisation d'automates, de dilueurs et d'autres équipements automatiques peut induire des différences de résultats par rapport à la technique manuelle. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de valider complètement le système et de s'assurer que les résultats soient conformes à la fiche technique et au certificat de contrôle de qualité.
12. Tous les équipements doivent être calibrés et doivent respecter les instructions du fabricant.

Conditions de conservation

1. Le coffret doit être stocké à 2-8°C et ne doit pas être congelé.
2. Le tampon de lavage dilué est stable pour une semaine à 2-8°C.
3. La date de péremption figure sur l'étiquette du coffret.

Echantillons

1. Les échantillons doivent être prélevés par ponction veineuse et le sérum doit être séparé après coagulation.
2. Les sérums peuvent être conservés à 2-8°C pendant 7 jours avant les tests⁶ ou aliquotés et congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue.
3. Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées.
4. Les sérums ne doivent pas être inactivés par la chaleur, ceci peut induire de faux positifs.

Procédure

Matériel fourni

- Une fiche technique : donnant tous les détails de la technique.
- Un certificat de contrôle qualité : indiquant les performances du lot.
- Puits recouverts de ADN db : 12 barrettes de 8 puits sécables cotés avec l'ADN db de thymus de veau. Chaque plaque est emballée dans un étui contenant deux dessiccateurs.
- Contrôle Négatif ELISA : 1 flacon de 1,2mL de sérum humain prédilué. La valeur est indiquée sur le certificat de contrôle qualité. Il est fourni prêt à l'emploi.
- Calibrateurs ADN db SC : 5 flacons, de 1,2mL de sérum humain dilué dont les concentrations en autoanticorps anti-ADN sont les suivantes : 1000; 333; 111; 37; 12,3 U/ml; chacun étant prêt à l'emploi.
- Contrôle positif ADN db SC : 1 flacon de 1,2mL de sérum humain prédilué. La valeur est indiquée sur le certificat de contrôle qualité. Il est fourni prêt à l'emploi.
- Diluant d'échantillons Type III : 2 flacons de 50mL de tampon prêt à l'emploi et coloré en jaune. Nécessaire à la dilution des échantillons.
- Tampon de lavage HRP concentré 40X : 1 flacon de 25mL de tampon concentré 40 fois pour le lavage des puits.

- Contrôle ADN db SC : flacon de 1,2mL de sérum humain prédilué. La valeur est indiquée sur le certificat de contrôle qualité. Il est fourni prêt à l'emploi.
- Conjugate ADN db SC IgG-HRP : 1 flacon de 10mL d'antisérum humaines purifié et conjugué à la peroxydase. Il est prêt à l'emploi et coloré en bleu.
- TMB Chromogène : 1 flacon de 10mL de TMB prêt à l'emploi.
- Solution d'arrêt HRP : 1 flacon de 10mL d'acide sulfurique 0,34M, prêt à l'emploi.

Autre matériel nécessaire non fourni

- Laveur automatique de plaque : recommandé, cependant les lavages manuels sont également possibles.
- Lecteur de microplaques : capable de mesurer la densité optique à 450nm.
- Eau distillée ou eau déionisée : elle doit être de très bonne qualité.
- Micropipettes : pour la distribution de volumes de 1000, 100 et 10µL.
- Pipette multicanaux : pour la distribution de volumes de 100µL de conjugué, de substrat et de solution d'arrêt.
- Tubes en plastique ou en verre : pour la dilution des échantillons.

Méthode

Préparation du test

1. Ramener le coffret à température ambiante
 - Ces coffrets sont opérationnels à une température comprise entre 20 et 24°C.
 - Avant utilisation, laisser le coffret à température ambiante pendant environ 60 minutes. Ne pas retirer les barrettes de leur sachet aluminium durant cette période. Attendre que les barrettes soient à température ambiante.

Note : Les coffrets peuvent être gardés à température ambiante au plus une semaine.

Composants du coffret

Mélanger chaque composant du coffret avant utilisation.

3. Dilution du tampon lavage (concentré 40 fois)

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

Dilution des échantillons

Diluer 10µL de chaque échantillon avec 1000µL de diluant (dilution 1:101) et mélanger.

Note : Les échantillons dilués doivent être utilisés dans les 8 heures suivant la dilution.

Manipulation des barrettes

Sortir le nombre nécessaire de puits et les enfilier sur le cadre. A partir de la position A1, remplir les colonnes de gauche à droite. Lors de la manipulation du cadre, le maintenir dans le sens de la longueur afin d'éviter que les barrettes de sortir de leur logement. Note : Les puits non utilisés doivent être immédiatement remplacés dans leurs étuis contenant un dessiccateur. Fermer hermétiquement les étuis afin de minimiser l'exposition à l'humidité. Faire attention de ne pas percer l'étui.

AVERTISSEMENT : L'exposition des puits à l'humidité ou à la contamination avec de la poussière ou des particules de matière induit une dégradation de l'antigène, induisant une faible précision des résultats et potentiellement des résultats faux positifs.

Exécution du test

Dépôt de l'échantillon

Déposer 100µL de chaque calibrateur, contrôle et échantillon dilué (1:101) dans les puits appropriés suivant le plan de plaque. Note : Les échantillons doivent être déposés sur la plaque aussi rapidement que possible afin de minimiser les écarts et le décompte du temps doit commencer après l'addition du dernier échantillon. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.

Lavage de la plaque

La procédure de lavage est très importante et requiert une attention spéciale. Une plaque mal lavée donnera des résultats incorrects avec une précision faible et un bruit de fond important. Après incubation, laver trois fois les puits avec 200 à 300µL de tampon de lavage en utilisant un laveur automatique ou manuellement comme indiqué ci-dessous. Après le lavage final, renverser la plaque et sécher les puits en tapant la plaque sur du papier absorbant.

Pour un lavage manuel :

- a. Jeter le contenu des plaques dans un évier.
- b. Tapoter les puits sur un papier absorbant.
- c. Remplir chaque puits avec 200 à 300µL de tampon de lavage à l'aide d'une pipette multicanaux.
- d. Agiter délicatement la plaque sur une surface plane.
- e. Répéter 2 fois cette procédure.
- f. Terminer en tapotant la plaque sur du papier absorbant.

Addition du conjugué

Déposer 100µL de conjugué par puits. Essuyer le bord des puits pour éliminer les éclaboussures.

Note : Afin d'éviter les contaminations, ne jamais remettre l'excès de conjugué dans le flacon d'origine.

Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.

Lavage de la plaque (cf. 2)

Addition du substrat TMB

Déposer 100µL de TMB dans chaque puits. Essuyer le bord des puits pour éliminer les éclaboussures.

Note : Afin d'éviter les contaminations, ne jamais remettre l'excès de TMB dans le flacon d'origine.

Incuber 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité.

Arrêt de la réaction

Ajouter 100µL de solution d'arrêt dans chaque puits. Ceci induit un changement de couleur du bleu au jaune.

Mesure de la densité optique

La densité optique (DO) de chaque puits doit être lue à 450nm à l'aide d'un lecteur de plaques dans les 30

minutes suivant l'arrêt de la réaction.

Contrôle de qualité

1. Contrôle de qualité

- Pour valider le test, tous les critères suivants doivent être respectés :
- Les calibrateurs, le contrôle positif ADN db, le contrôle négatif et le contrôle ADN sb doivent être inclus dans chaque test.
 - Les valeurs obtenues pour tous les contrôles doivent être dans les gammes spécifiées sur la fiche de contrôle qualité.
 - La forme de la courbe doit être similaire à celle fournie sur le certificat de contrôle qualité.

Si les critères ci-dessus ne sont pas respectés, le test est invalide et doit être répété.

- 2. Calcul des moyennes de DO (Pour les tests ayant été faits en double)**
 Pour chaque calibrateur, contrôle et échantillon, calculer la DO moyenne. Le pourcentage du coefficient de variation (CV en %) pour chaque duplicat doit être inférieur à 15%.

- 3. Etablissement de la courbe de calibration**
 La courbe de calibration peut être tracée automatiquement ou manuellement en plaçant les concentrations en anticorps anti-ADN db (échelle logarithmique) sur l'axe des X et la densité optique de chaque calibrateur sur l'axe des Y (échelle linéaire). Automatique : choisir un tracé de courbe pour lequel les résultats sont les meilleurs. Manuel : utiliser du papier log/linéaire, tracer une courbe qui joints les points (pas une droite, ni une courbe point à point).

- 4. Traitement des points anormaux**
 Si seul un point n'est pas sur la courbe, il peut être supprimé. Si en l'absence de ce point, la courbe a une forme différente de celle du certificat de contrôle de qualité ou si plusieurs points ne sont pas sur la courbe, le test doit être répété.

- 5. Calcul des concentrations d'autoanticorps dans les contrôles et les échantillons dilués**
 Lire la concentration en autoanticorps anti-ADN db des contrôles et des échantillons dilués à partir de la courbe de calibration. Les valeurs des contrôles doivent être comprises dans les limites indiquées sur le certificat de contrôle qualité. **Note :** Les valeurs des calibrateurs ont été ajustées d'un facteur 100 pour tenir compte de la dilution des échantillons (1:101). Aucune autre correction n'est nécessaire.

- 6. Calibration du test**
 Le test est calibré en UI/mL par rapport au calibrateur de référence OMS Wo80.7

Limites du test

- Ce coffret est utilisé pour aider au diagnostic seulement. Un résultat positif suggère certaines maladies qui doivent être confirmées par les données cliniques et par d'autres tests sérologiques.
- Les résultats obtenus ne sont pas une preuve diagnostique de la présence ou de l'absence de maladies.
- Les résultats douteux doivent être rétestés avec un sérum frais. Il est important de tester les sérums de patients régulièrement pour suivre les changements éventuels de concentration en anticorps anti-ADN.

Valeurs Normales

La gamme normale a été déterminée à partir de 113 sérums de donneurs de sang sains. La limite supérieure de la normale est exprimée par la concentration moyenne plus 5 déviation standard (DS), elle est égale à 30 UI/mL, avec une moyenne à 9,2 UI/mL et une DS de 4,4 UI/mL.
 La valeur ci-dessus n'est fournie qu'à titre indicatif. Les tests ELISA sont très sensibles et capables de détecter de faibles différences dans la population. Il est recommandé à chaque laboratoire de déterminer sa propre norme, basée sur l'équipement utilisé et les techniques employées.

INTERPRETATION

< 30 UI/mL	résultat négatif
30-75 UI/mL	résultat douteux
> 75 UI/mL	résultat positif

Précision

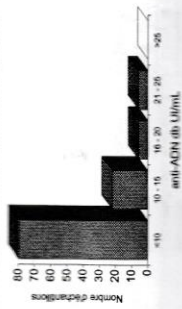
La précision intra- et inter-essai a été mesurée en utilisant 3 échantillons à l'intérieur de la gamme de la courbe de calibration. La moyenne et le pourcentage du coefficient de variation (CV en %) pour chaque échantillon sont donnés ci-dessous.

PRECISION INTRA-ESSAI		
n=16	Concentration (UI/mL)	CV en %
Echantillon 1	81	5,0
Echantillon 2	283	3,7
Echantillon 3	674	8,1

PRECISION INTER-ESSAI		
n=3	Concentration (UI/mL)	CV en %
Echantillon 1	81	9,2
Echantillon 2	283	9,5
Echantillon 3	674	8,6

GAMME NORMALE

Les concentrations d'autoanticorps anti-ADN db sont mesurées à partir de 113 sérums de donneurs de sang sains, les résultats sont indiqués sur le graphique ci-dessous. Pour un seuil basé à 30 UI/mL, aucun de ces échantillons ne serait considéré comme douteux ou positif.



Spécificité, Sensibilité, Corrélation

La spécificité relative, la sensibilité et la corrélation ont été déterminées par rapport à un coffret ELISA d'un autre fournisseur et par rapport à l'immunofluorescence sur Crithidia Luciliae en utilisant 69 échantillons. Pour la comparaison de notre coffret avec l'immunofluorescence sur Crithidia, les échantillons donnant des résultats douteux en ELISA ont été considérés comme positifs.

EIA		Autre coffret commercial ELISA anti-ADN db	
Coffret ELISA BINDAZYME anti-ADN db	+	41	0
Douteux	Douteux	0	4
	-	0	1
Sensibilité relative			97,8%
Spécificité relative			95,7%
Corrélation relative			97,1%

Crithidia luciliae		Crithidia luciliae	
Coffret ELISA BINDAZYME anti-ADN db	+	44	2
Douteux	-	2	21
Sensibilité relative			95,7%
Spécificité relative			91,3%
Corrélation relative			94,2%

Sensibilité Analytique

La sensibilité a été déterminée comme étant la concentration moyenne plus 2 déviations standard (DS) donnée par 20 déterminations du diluant de l'échantillon. Elle est égale à 4,6 UI/mL.

Substances d'interférence

Différents types de sérums ont été testés en utilisant le coffret Interference Check A plus™ (Kokusai, Japon) pour évaluer l'effet possible de substances interférentes.

Substance	Concentration
Bilirubine F libre	18,3mg/dL
Bilirubine C conjuguée	19,0mg/dL
Hémoglobine hémolysée	490mg/dL
Chyle	1930 unités
Facteur rhumatoïde	50 UI/mL

Aucune interférence n'a été observée avec la bilirubine libre ou conjuguée, ni avec l'hémoglobine, les lipides ou le facteur rhumatoïde.

Gamme de Mesure

La gamme de mesure du coffret est de 12,3 à 1000 UI/mL.

REF 704715

Indication

Cette trousse permet le dépistage qualitatif *in vitro* des autoanticorps spécifiques IgG dirigés contre les antigènes nucléaires solubles (ENA) : SSA/Ro (60 et 52 kD), SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70 et Jo-1, dans le sérum humain. Il apporte une aide dans le diagnostic de certaines maladies rhumatoïdes systémiques.

Cette trousse permet de tester au maximum 12 échantillons en simple pour chacun des 6 anti-ENA, avec un contrôle seuil et un contrôle positif.

Informations concernant le test

Les autoanticorps dirigés contre les ENA apparaissent chez un grand nombre de patients atteints de maladies rhumatoïdes systémiques⁴⁵. Ces maladies sont caractérisées par la présence d'un ou de plusieurs autoanticorps ENA, comme résumé ci-dessous :

Autoanticorps spécifique	Principales maladies associées	% d'apparition
SSA/Ro (60 et 52 kD) ^{7,9}	Syndrome de Sjögren SLE Lupus néonatal	40 - 70 25 - 30 *
SSB/La ^{2,9}	Syndrome de Sjögren SLE Sclérodermie systémique Lupus néonatal	50 - 60 * * *
Sm ^{7,10}	SLE	25-40
Sm/RNP ⁷	MCTD SLE	95 - 100 25-40
Scl-70 ¹¹	Sclérodermie CREST Phénomène primaire de Reynaud	20 - 28 * *
Jo-1 ¹²	Polymyosite	18 - 36

SLE - lupus érythémateux systémique
MCTD - connectivite mixte

⁴⁵La spécificité des autoanticorps a été associée à une ou plusieurs maladies mais les pourcentages d'apparition n'ont pas été déterminés.

Principe du test

Chaque puits à l'intérieur d'une barrette de 8 puits est coaté avec l'un des antigènes suivants : SSA/Ro (60 et 52 kD), SSB/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70 ou Jo-1 comme indiqué dans le tableau suivant. Les contrôles prédiluisés et les échantillons de patients dilués sont ajoutés aux puits et les autoanticorps reconnaissant les antigènes se lient durant la première incubation. Après avoir rincé les puits pour éliminer toute trace de protéines non liées, un substrat marqué avec un anticorps anti-IgG est ajouté. Les puits sont rincés à nouveau. Le conjugué se lie aux autoanticorps humains capturés. Les puits de conjugué sont ensuite rincés. Le conjugué est ensuite marqué avec un substrat utilisant du 3',3',5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) qui produit une réaction de couleur. Le temps de lecture dépend de la concentration d'autoanticorps dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté à chaque puits pour arrêter la réaction. Le produit final induit est coloré en jaune et la densité optique est lue à 450 nm.

Antigène coaté/échantillon correspondant sur la plaque

Rangée	Antigène ENA	Contrôle/échantillon
A	Antigène de contrôle	Contrôle seuil
B	Antigène de contrôle	Contrôle positif
C	SSA (52 & 60 kD)	Echantillon
D	SSB	Echantillon
E	Sm	Echantillon
F	Sm/RNP	Echantillon
G	Scl-70	Echantillon
H	Jo-1	Echantillon

ANNEXE IV

Fiche technique du réactif Inova Diagnostics, QUANTA Lite ENA Profile EIA.

Réactifs

- Plaque de microtitration ELISA revêtu d'antigènes ENA purifiés comme indiqué dans le tableau ci-dessus. Chaque plaque est emballée dans un étui aluminium contenant 2 dessiccateurs.
- Note : les barrettes ne peuvent être placées que dans un seul sens sur le cadre pour conserver l'alignement correct des rangées.
- Contrôle seuil profil ELISA ENA pré-dilué, 1 flacon de 1,6 ml de sérum humain, dans du tampon avec du stabilisateur.
- Contrôle positif profil ENA pré-dilué, 1 flacon de 1,6 ml de sérum humain, dans du tampon avec du stabilisateur.
- Diluant d'échantillons type III, teinté en jaune, 1 flacon de 50 ml avec du Tween 20, des stabilisateurs de protéines et des conservateurs.
- Tampon de lavage HRP concentré 40x, teinté en rouge, 1 flacon de 25 ml avec du tampon Tris salin, du Tween 20 et des conservateurs. Consulter le paragraphe « Méthode » pour connaître les instructions de dilution.
- Conjugué HRP profil ENA IgG, teinté en bleu, 1 flacon de 10 ml, dans du tampon avec des stabilisateurs de protéines et des conservateurs.
- Chromogène TMB, 1 flacon de 10 ml avec des stabilisateurs.
- Solution d'arrêt HRP, acide sulfurique 0,344M, non teinté, 1 flacon de 10 ml.

Avertissements

- ATTENTION : le diluant, d'échantillons, les contrôles et le conjugué contiennent 0,02 % de chloramphénicol, considéré comme cancérigène dans l'état de Californie. Le diluant d'échantillons contient du Proclin 150. Éviter toute inhalation, toute ingestion et tout contact avec la peau ou les yeux.
- Toutes les substances d'origine humaine utilisées pour la préparation des contrôles ont été testées et ont donné un résultat négatif lors de la recherche d'anticorps anti-VIH, anti-antigène de surface de l'hépatite B et anti-virus de l'hépatite C à l'aide de tests approuvés par la FDA. Cependant, aucune méthode ne peut donner une garantie complète quant à l'absence de VIH, de VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. En conséquence, tous les sérums humains de contrôle doivent être manipulés avec les mêmes précautions que celles utilisées pour un matériel potentiellement infectieux¹⁵.
- L'azide de sodium est utilisé comme conservateur. Il s'agit d'un poison, toxique en cas d'ingestion et de contact avec les yeux et la peau. L'azide de sodium peut réagir au contact du plomb ou du cuivre des canalisations et former des azides de métaux potentiellement explosifs. Après l'évacuation des réactifs, laver à grande eau afin d'éviter des dépôts dans les canalisations.
- Le conjugué HRP profil ENA IgG contient un composant chimique dilué qui est un poison corrosif, toxique en cas d'ingestion en grande quantité. Pour éviter des brûlures chimiques, il est recommandé d'éviter tout contact avec la peau ou les yeux.
- Le chromogène TMB est irritant et peut être toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et d'absorption par la peau. Éviter toute inhalation, toute ingestion et tout contact avec la peau ou les yeux.
- La solution d'arrêt HRP est une solution diluée d'acide sulfurique. Éviter de l'exposer aux bases ou aux métaux ou à tout autre composé susceptible de réagir avec les acides. L'acide sulfurique est un poison corrosif, toxique en cas d'absorption. Éviter le contact avec la peau et les yeux pour éviter toute brûlure chimique.
- Lors de la manipulation de ces produits, utiliser les équipements de protection personnelle appropriés.
- Les élaboussures de réactifs doivent être nettoyées immédiatement. Respecter les règlements en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Précautions

- Ce test est pour un usage diagnostique *in vitro*.
- Il doit être utilisé par un personnel formé.
- Il est recommandé de suivre scrupuleusement le protocole. Toute violation peut affecter les performances et les résultats obtenus. Lire attentivement les « Notes » et les « Avertissements ».
- Les réactifs des trousseaux ayant des numéros de lots différents NE SONT PAS interchangeables. Si de grandes séries de tests doivent être réalisées, vérifier que tous les réactifs aient le MÊME numéro de lot. Toutes les barrettes utilisées doivent être issues du même sachet aluminium. La substitution de certains réactifs peut induire des résultats incorrects.
- Afin d'éviter la contamination des réactifs, utiliser uniquement de nouveaux récipients ou des récipients propres en verre ou en plastique. Ne jamais remettre les réactifs non utilisés dans leur flacon d'origine. S'assurer que le tampon de lavage soit dilué dans un récipient propre. Si après dilution, la solution devient trouble lors du stockage, l'éliminer et préparer une nouvelle solution.
- Ne pas laisser les réactifs sans bouchon ; l'évaporation ou la contamination des réactifs peut induire des résultats incorrects.
- Le substrat TMB ne doit pas être exposé à la lumière ou mis en contact avec de l'eau.
- Les échantillons et sérums hémolysés, lipémiques, contaminés par des bactéries ou contenant des particules de matières ne doivent pas être utilisés.
- Une dilution incorrecte de l'échantillon ne peut être vérifiée étant donné que les contrôles de la trousse sont prêts à l'emploi. Il est recommandé d'utiliser des pipettes calibrées et des échantillons appropriés pour un contrôle de qualité interne.
- L'utilisation d'automates, de diluteurs et d'autres équipements automatiques peut induire des différences de résultats par rapport à la technique manuelle. Il est de la responsabilité de chaque laboratoire de valider complètement le système et de s'assurer que les résultats soient conformes à la fiche technique et au certificat de contrôle de qualité.
- Tous les équipements doivent être calibrés et doivent respecter les instructions du fabricant.

Conditions de conservation

- La trousse doit être stockée entre 2 et 8°C et ne doit pas être congelée. Une température de stockage inappropriée peut affecter les résultats.

- Le tampon de lavage dilué peut être stocké entre 2 et 8°C pendant 4 semaines et peut être utilisé directement après sa sortie du réfrigérateur ou après avoir été ramené à température ambiante indifféremment.
- La date de péremption figure sur l'étiquette de la trousse.

Prélèvement des échantillons

- Les échantillons de sang doivent être prélevés par ponction veineuse et le sérum doit être séparé après coagulation naturelle.
- Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 8°C pendant 7 jours¹³ avant les tests ou aliquotés et congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue.
- Congélations et décongélation répétées doivent être évitées.
- Les sérums ne doivent pas être inactivés par la chaleur, ceci peut inclure de faux positifs.

Procédure

Matériel fourni

- Fiche d'instructions** : contient tous les détails du dosage.
- Certificat de contrôle qualité** : indique les performances prévues pour le lot.
- Puits recouverts d'ENA** : 12 barrettes de 8 puits. Chaque puits est coâté avec les antigènes purifiés ENA comme indiqué dans le tableau Principe du test. Chaque plaque est emballée dans un étui aluminium contenant 2 dessiccateurs. **Note** : les barrettes ne peuvent être placées que dans un seul sens sur le cadre pour conserver l'alignement correct des rangées.
- Diluant d'échantillons type III** : 1 flacon de 50 ml de tampon prêt à l'emploi. Nécessaire à la dilution des échantillons.
- Tampon de lavage HRP concentré** : 1 flacon de 25 ml de tampon concentré 40 fois pour le lavage des puits.
- Contrôle seuil profil ELISA ENA** : 1 flacon de 1,5 ml de sérum humain dilué. Le résultat ENA attendu est donné dans le certificat de contrôle qualité. Il est fourni prêt à l'emploi.
- Contrôle positif profil ENA** : 1 flacon de 1,5 ml de sérum humain dilué. Le résultat ENA attendu est donné dans le certificat de contrôle qualité. Il est fourni prêt à l'emploi.
- Conjugué HRP profil ENA IgG** : 1 flacon de 10 ml d'anticorps anti-IgG humaines conjugués à la peroxydase. Il est prêt à l'emploi et coloré en bleu.
- Chromogène TMB** : 1 flacon de 10 ml de substrat TMB prêt à l'emploi.
- Solution d'arrêt HRP** : 1 flacon de 10 ml d'acide sulfurique 0,34M prêt à l'emploi.

Autre matériel nécessaire non fourni

- Laveuse automatique de plaque : recommandé, cependant les lavages manuels sont également possibles.
- Lecteur de microplaques : capable de mesurer la densité optique à 450 nm.
- Eau distillée ou eau déionisée : elle doit être de très bonne qualité.
- Micropipettes étalonnées : pour la distribution de volumes de 10 à 1000 µl.
- Pipette multicanaux : recommandée pour la distribution de volumes de 100 µl de conjugué, de substrat et de solution d'arrêt.
- Tubes en plastique ou en verre : pour la dilution des échantillons.

Méthode

Préparation du test

- Ramener la trousse à température ambiante**
 - Ces trusses sont opérationnelles à une température comprise entre 20 et 24°C.
 - Avant utilisation, laisser la trousse à température ambiante pendant environ 60 minutes. **Ne pas retirer** les barrettes de leur sachet aluminium durant cette période. Attendre que les barrettes soient à température ambiante. **Note** : la trousse peut être gardée à température ambiante au plus une semaine.
- Composants**

Tous les réactifs de la trousse doivent être agités avant utilisation.
- Préparation du tampon de lavage**

Diluer la totalité de la solution de lavage concentrée avec 975 ml d'eau distillée ou déionisée (1/40). Si la totalité de la plaque de microtitration n'est pas utilisée en une seule fois, un plus petit volume de tampon sera suffisant, par exemple pour traiter 15 puits, diluer 2 ml de tampon concentré dans 78 ml d'eau distillée ou déionisée. La solution de tampon diluée reste stable une semaine entre 2 et 8°C. Si la trousse ne doit pas être utilisée en une seule fois, de plus petits volumes peuvent être dilués comme recommandé. Si le tampon montre des signes de contamination bactérienne ou s'il devient trouble, l'éliminer et préparer une nouvelle solution.
- Manipulation des barrettes**

Une barrette est nécessaire pour le test d'un échantillon. Placer le nombre requis de barrettes sur le cadre. A partir de la position A1, remplir les colonnes de gauche à droite. Lors de la manipulation du cadre, le maintenir dans le sens de la longueur afin d'empêcher les barrettes de sortir de leur logement. **Note** : les puits non utilisés doivent être immédiatement remplacés dans leurs étuis contenant deux dessiccateurs. Fermer hermétiquement les étuis afin de minimiser l'exposition à l'humidité. Faire attention de ne pas percer ni déchirer l'étui, cf. ci-dessous. **AVERTISSEMENT** : l'exposition des puits à l'humidité ou à la contamination avec de la poussière ou des particules de matière induit une dégradation de l'activité, induisant une faible précision des résultats et potentiellement des résultats faux positifs. Dilution des échantillons
Diluer 10 µl de chaque échantillon avec 1000 µl de diluant (1:10) et bien mélanger. **Note** : les dilutions doivent être utilisées dans les 8 heures suivant leur préparation. **Note** : les contrôles positif et seuil sont prêts à l'emploi et ne requièrent aucune dilution.

Exécution du test

- Dépôt de l'échantillon**

Maintenir la même séquence de dépôt durant tout le test.

Utiliser une barrette par échantillon, déposer 100 µl des contrôles prêts à l'emploi : le contrôle seuil en position A et le contrôle positif en position B sur toutes les barrettes. Ajouter 100 µl de chaque échantillon dilué (1:10) aux 5 puits restants des barrettes. **Note** : les échantillons doivent être déposés sur la plaque le plus rapidement possible afin de minimiser les écarts et le décompte du temps doit commencer après l'addition du dernier échantillon. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.**
- Lavage de la plaque**

La procédure de lavage est très importante et requiert une attention spéciale. Une plaque mal lavée donnera des résultats incohérents avec une précision faible et un bruit de fond important. Après incubation, laver trois fois les puits avec 200 à 300 µl de tampon de lavage par puits en utilisant un laveur automatique ou manuellement comme indiqué ci-dessous. Après le lavage automatisé final, renverser la plaque et sécher les puits en retournant la plaque sur du papier absorbant.

 - Les puits doivent être lavés indépendamment en procédant ainsi :
 - Renverser le contenu de la barrette.
 - Tapoter les puits sur du papier absorbant.
 - Remplir chaque puits de 200 à 300 µl de tampon de lavage à l'aide d'une pipette multicanaux.
 - Secouer légèrement la plaque sur une surface plane.
 - Répéter deux fois les étapes a à d.
 - Répéter les étapes a et b.
- Addition du conjugué**

Déposer 100 µl de conjugué par puits. Essayer les bords des puits pour éliminer les éclaboussures. **Note** : afin d'éviter les contaminations, ne jamais remettre l'excès de conjugué dans le flacon d'origine.
- Lavage de la plaque**

Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.

(cf. 2)
- Addition du substrat TMB**

Déposer 100 µl de TMB dans chaque puits. Essayer les bords des puits pour éliminer les éclaboussures. **Note** : afin d'éviter les contaminations, ne jamais remettre l'excès de TMB dans le flacon d'origine. **Incuber 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**
- Arrêt de la réaction**

Ajouter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Ceci induit un changement de couleur du bleu au jaune.
- Mesure de la densité optique**

La densité optique (DO) de chaque puits doit être lue à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque dans les 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

Contrôle de qualité

- Contrôle de qualité**

Pour valider le test, tous les critères suivants doivent être respectés :

 - Le contrôle seuil et le contrôle positif doivent être inclus lors de chaque série de tests.
 - La densité optique obtenue pour le contrôle seuil et le résultat ENA du contrôle positif doivent être dans les plages spécifiées sur le certificat de contrôle qualité.

Si les critères ci-dessus ne sont pas respectés, le test est invalide et doit être recommencé.
- Calcul des résultats**

Pour calculer le résultat ENA de chaque échantillon, utiliser la formule suivante :

$$\text{DO contrôle positif ou échantillon} \times 10 = \text{Valeur contrôle ou échantillon (U/ml)} \\ \text{DO contrôle seuil}$$

Les échantillons donnant des résultats douteux doivent être confirmés avec la trousse ENA spécifique correspondante.

Calibration du test

- Le test est calibré contre une référence arbitraire. Les résultats ENA sont semi-quantitatifs et sont définis par la formule donnée ci-dessus.

Interprétation des valeurs Sm et RNP
 Un échantillon est négatif pour les anticorps anti-Sm et mais positif en anti-RNP. La réactivité est due à la présence d'anticorps anti-RNP uniquement. Si la valeur en anti-Sm est positive et équivalente à la valeur en anti-RNP, alors l'activité est largement due à la présence d'anticorps anti-Sm. Un échantillon qui est positif pour les anticorps anti-Sm et anti-RNP. Il est difficile d'estimer l'activité spécifique en anti-RNP d'échantillons donnant une DO supérieure à ce qu'un lecteur de plaque peut mesurer. En diluant l'échantillon au 1/2000 ou au 1/400, ceci permet de savoir si l'activité RNP est supérieure à celle de Sm.

Limites du test

- Cette trousse est utilisée comme aide au diagnostic uniquement. Un résultat positif suggère certaines malades qui doivent être confirmées par des observations cliniques.
- Les résultats obtenus à partir de ce test ne sont pas une preuve diagnostique de la présence ou l'absence de maladie.

Valeurs prévues

Le contrôle seuil a été établi à un point équivalent à la limite normale supérieure, en conséquence 3 échantillons différents ont été trouvés positifs pour SSB, RNP et Scl-70. Les résultats des 120 échantillons ont été confirmés en utilisant les trousses BINDAZYME de chacune des spécificités. Les plaques sont fournies à titre indicatif. Les tests ELISA sont très sensibles et capables de détecter de faibles différences dans les différents échantillons. Il est recommandé à chaque laboratoire de déterminer sa propre plage normale basée sur les conditions locales de population, de techniques et d'équipement.

Résultat ENA	Interprétation
<8,0	Négatif
8-12	Douteux
>12,0	Positif

Performances Spécifiques Fidélité

La fidélité intra-essai a été mesurée en testant en double 12 fois un échantillon ayant une valeur moyenne pour chaque spécificité sur une seule plaque.

Spécificité	FIDÉLITÉ INTRA-ESSAI	
	Valeur moyenne (Densité optique)	C.V. en %
SSA	3,10	1,8
SSB	1,31	5,9
Sm	2,41	3,8
Sm/RNP	2,16	3,0
Scl-70	2,19	2,9
Jo-1	1,44	2,6

La fidélité inter-essais a été mesurée en testant un échantillon négatif, un échantillon positif faible et un échantillon positif fort pour chaque spécificité sur trois lots de trousses.

Spécificité	FIDÉLITÉ INTER-ESSAIS					
	Echantillon 1		Echantillon 2		Echantillon 3	
	U/ml	C.V. %	U/ml	C.V. %	U/ml	C.V. %
SSA/Ro	3,3	6,1	15,5	7,1	29,3	6,1
SSB/La	1,9	15,8	23,6	12,7	27,9	19,0
Sm	3,7	8,1	19,4	8,3	37,5	10,7
Sm/RNP	7,7	5,2	19,3	5,2	46,3	11,9
Scl-70	2,6	15,4	18,2	5,0	31,8	4,4
Jo-1	3,1	16,1	19,5	6,7	45,3	9,1

Spécificité, sensibilité et concordance relatives

La spécificité, la sensibilité et la concordance relatives ont été déterminées en testant 139 échantillons positifs en ENA (141 Scl-70) avec la trousse profil ENA et les trousses BINDAZYME de chacune des spécificités.

TROUSSE ELISA BINDAZYME	Trousse de chaque spécificité		Corrélations relatives (%)	
	+	-	Sensibilité	Spécificité
SSA/Ro	+ 66	3	100	95,9
	- 0	70		97,8
SSB	+ 26	0	96,3	100
	- 1	112		99,3
Sm	+ 18	0	90	100
	- 2	119		98,6
Sm/RNP	+ 63	2	96,9	97,3
	- 2	72		97,1
Scl-70	+ 13	5	100	96,1
	- 0	123		96,5
Jo-1	+ 21	2	100	98,3
	- 0	116		98,6

14 des 17 résultats discordants étaient douteux avec les trousses spécifiques et proches de la valeur seuil du test (valeur la plus élevée à 12,5 U/ml et la majorité était < 11,0 U/ml).

Corrélation avec les sérums de référence CDC

Les sérums de référence CDC ont été testés pour confirmer la spécificité de la trousse profil ELISA ENA. Ces sérums ont été complètement décrits par Tan¹⁴.

Antigène	CDC-1 Homogène/anneau	CDC-2 Moucheté/SSB	CDC-3 Moucheté	CDC-4 RNP	CDC-5 Sm
SSA	pos. (31,3)	pos. (32,9)	pos. (31,3)	pos. (24,0)	pos. (24,0)
SSB	pos. (42,7)	pos. (42,7)	pos. (42,7)	pos. (42,7)	pos. (42,7)
Sm	pos. (20,6)	pos. (19,9)	pos. (19,9)	pos. (19,9)	pos. (19,9)
Sm/RNP	pos. (28,9)	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)
Scl-70	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)
Jo-1	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)	pos. (>61)

Antigène	CDC-6 nucléolaire	CDC-7 SSA	CDC-8 centromère	CDC-9 Scl-70	CDC-10 Jo-1
SSA	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)
SSB	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)
Sm	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)
Sm/RNP	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)
Scl-70	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)
Jo-1	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)	pos. (46,4)

Tous les sérums ont été correctement identifiés par rapport au tableau 2 de la référence ci-dessus.
Note : les échantillons CDC-6 et -8 contiennent des anticorps anti-fibrilline et anti-centromère respectivement et ne sont par conséquent pas détectés par cette trousse.

La majorité des sérums positifs pour des anti-Jo-1 peuvent également contenir des anticorps anti-SSA de 52 kD. Ceci semble être le cas pour le CDC-10 qui est positif pour les anti-SSA avec la trousse profil ENA mais négatif avec la trousse SSA/Ro 60 kD uniquement.

Substances interférentes

Une gamme de substances interférentes a été ajoutée à des échantillons positifs et négatifs pour les ENA. La méthode utilisée pour vérifier ces substances est basée sur la trousse interférence Check A plusTM de Kokusai Shiyaku, Japon.

Substance	Concentration
Bilirubine F (libre)	18,3 mg/dl
Bilirubine C (conjuguée)	19,0 mg/dl
Hémoglobine hémolysée	490 mg/dl
Chyle	1930 unités

Aucune interférence n'a été observée.

Plan de plaque

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

RESUME

Les connectivites sont des maladies auto-immunes systémiques, elles sont dotées d'un grand polymorphisme clinique et caractérisées par la production d'une grande variété d'auto-anticorps dont les cibles antigéniques ont été identifiées. La révélation biologique des connectivites, qui est d'une grande valeur se base sur la détection et l'identification des auto-anticorps impliqués dans la maladie, cette exploration peut se faire par divers techniques, notamment par l'ELISA.

Par la présente étude, une appréciation des performances de la technique ELISA appliqué à l'exploration immunologiques des connectivites a été effectuée sur 51 personnes, au niveau du laboratoire de Biochimie du C.H.U NEDDIR Med de Tizi-Ouzou. Un échantillon de 36 personnes (jugées saines) a été choisi pour l'évaluation de la spécificité, la technique ELISA a eu une valeur de 91,67% pour le dépistage et 94,40% pour le dosage DNA. Un échantillon de 15 personnes (positifs et négatifs) a été choisi pour l'évaluation de la fidélité, une variation inférieure à 10% et à 15% pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire respectivement.

Parallèlement, notre laboratoire considère la valeur 20UA/ml, proposée par le fournisseur des réactifs, utilisés pour l'ELISA, comme valeur de référence du seuil de positivité des ANA, ceci dit, chaque laboratoire a pour obligation de valider et de transférer cette valeur sur sa population locale. Nous avons donc étudié et validé cette valeur de référence, qui se révéla être une valeur appropriée.

En conclusion, la technique ELISA appliquée à l'exploration des connectivites présente une cohérence entre le dépistage, l'identification et le contexte clinique. De ce fait elle présente une bonne spécificité et fidélité.

Mots clés : Connectivites, ELISA, Spécificité, Fidélité, ANA, Valeur de référence.

ABSTRACT

Connectivitis is a systemic autoimmune disease with a large clinical polymorphism and characterized by the production of a wide variety of auto-antibodies with identified antigenic targets. The valuable biological revelation of connectivitis is based on the detection and identification of auto-antibodies involved in the disease, which can be explored by various techniques, including ELISA.

In the present study, an evaluation of the performance of the ELISA technique applied to the immunological exploration of connectivitis was carried out on 51 persons at the Biochemistry laboratory of the C.H.U NEDDIR Med of Tizi-Ouzou. A sample of 36 persons (considered healthy) was chosen for the evaluation of specificity, the ELISA technique had a value of 91.67% for screening and 94.40% for DNA assay. A sample of 15 persons (with connectivitis) was chosen for the evaluation of precision, a variation of less than 10% and 15% for repeatability and intermediate precision respectively.

At the same time, our laboratory considers the 20UA/ml value, proposed by the supplier of the reagents used for the ELISA, as a reference value for the ANA positivity threshold. However, each laboratory has the obligation to validate and transfer this value to its local population. We therefore studied and validated this reference value, which proved to be an appropriate value.

In conclusion, the ELISA technique applied to the exploration of connectivitis shows consistency between screening, identification and clinical context. Therefore, it has a good specificity and fidelity.

Keywords : Connectivitis, ELISA, Specificity, Fidelity, ANA, Reference value.