

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



Département de Biochimie et Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master de Biologie  
Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

**Etude de la contribution du Lymphocyte B à  
l'immuno-pathologie du Lupus Erythémateux  
Systémique**

Présenté et soutenu par : *SEDKAOUI Fatiha*

Le : 27/09/2017

AKLI Hassina

## Jury d'évaluation

President de jury: Mr OUELHADJ A.

Maitre de conférences A (UMMTO)

Promoteur : Mr YEZID H.

Maitre de conférences B (UMMTO)

Examineur : Mr MOUALEK I.

Maitre assistant A (UMMTO)

Examinatrice : Mlle BEN AHMED DJILALI A.

Maitre de conférences A (UMMTO)

**Année Universitaire : 2016-2017**

## ***REMERCIEMENTS...***

Nous tenons tout d'abord à remercier notre DIEU qui nous donner la force, la santé et la volonté pour accomplir ce travail.

Nous sincères remerciements s'adressent ensuite à : Notre promoteur :  
Monsieur YEZID H. : Maitre de conférences B à l'UMMTO, qui à bien voulu nous encadrer et a veillé au bon suivi de notre travail par ses précieux conseils et ses orientations.

Nous tenant également à remercier les membres de jury qui nous font l'honneur de présider et d'examiner notre travail.

Monsieur OUELHADJ A. : Maitre de conférences A à l'UMMTO, d'avoir accepté de présider le jury.

Monsieur MOUALEK I. : Maitre assistant A à l'UMMTO, d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'être parmi le jury.

Mademoiselle BEN AHMED DJILALI A. : Maitre de conférences A à l'UMMTO, d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'être parmi le jury. Nos remerciements vont aussi vers toute l'équipe de laboratoire d'hémobiologie du C.H.U de Tizi-Ouzou et du laboratoire d'immunologie d'E.P.H de Rouïba.

Enfin, on remercie tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation ce mémoire.

## *Dédicace ...*

*J'ai l'honneur de dédie ce travail à mes très chers parents, pour leurs soutiens et encouragements accomplis pour mener à bien notre réussite.*

*A mes deux frères, à ma cousine et mes adorables amis, pour leur compréhension, leur soutien et leur tendresse*

*A toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de  
Ce mémoire.*

*Sedkaoui Fatiha*

*J'ai l'honneur de dédie ce travail à mes très chers parents, pour leurs soutiens et encouragements accomplis pour mener à bien notre réussite.*

*A mes très chers frères, cousines, ainsi que tous mes proches et amis, qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Que ce travail soit le témoin de ma reconnaissance.*

*Qu'Allah nous protège.*

*Akli Hassina*

# SOMMAIRE :

Liste des Figures

Liste de tableaux

Liste des abréviations

**INTRODUCTION GENERALE ..... 1**

**CHAPITRE-I: GENERALITES SUR LES ..... 4**

1. Définition de l'auto-immunité ..... 4

2. Définition du Lupus Érythémateux Systémique (LES) ..... 4

3. Aspects clinique ..... 5

3.1. Manifestation cutanée ..... 5

3.2. Manifestation articulaires ..... 5

3.3. Manifestation pulmonaire ..... 6

3.4. Manifestation vasculaire ..... 6

3.5. Manifestation rénale ..... 6

3.6. Manifestation sanguine ..... 6

3.7. Manifestation neurologique ..... 6

3.8. Manifestation digestive ..... 7

4. Diagnostic et critères de classification ..... 8

4.1. Critères de classification ..... 8

5. Epidémiologie ..... 11

6. Les causes ..... 12

6.1. Facteurs génétiques ..... 14

6.2. Facteurs hormonaux ..... 15

6.3. Facteurs environnementaux ..... 16

7. Le système des scores (SLEDAI-K2) ..... 16

**CHAPITRE-2: IMMUNOBIOLOGIE ..... 20**

1. La dérégulation des fonctions des cellules du système immunitaire innée dans le lupus. 21

1.1. Neutrophiles.....	22
1.2. Macrophages.....	22
1.3. Cellules dendritiques .....	22
1.4. Cellules NK .....	22
2. Les cellules de la réponse immunitaire adaptative et lupus .....	23
2.1. Lymphocytes T .....	23
2.2. Rôles des lymphocytes B dans le LES .....	26
2.2.1. Développement et maturation des cellules B normaux dans la moelle osseuse .....	26
2.2.2. Activation des LB normaux dans les organes lymphoïdes secondaires après rencontre avec les antigènes .....	29
2.2.3. Perte de tolérance des cellules B dans le lupus .....	30
2.2.4. Les anomalies des lymphocytes B chez les patients LES .....	31
2.3. Les auto-anticorps dans le lupus.....	32
2.4. Les complexes immuns du lupus (CI) .....	34
3. Traitements .....	34
3.1. Traitements généraux .....	34
3.2. Traitements biologiques (Biothérapie) .....	36
3.2.1. Anticorps monoclonaux dirigés contre les LB .....	36
3.2.2. Traitements ciblant les autres cellules du système immunitaire.....	37
<b>CHAPITRE-3: MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>39</b>
Collecte des échantillons .....	39
Méthodes .....	39
1. Cytométrie en flux.....	39
2. Recherche des auto-anticorps .....	41
2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI).....	42
2.2. ELISA anti-dsDNA (IgG) .....	45
2.2. ELISA profil anti-ENA (IgG).....	47
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>51</b>
1. Quantification des populations de cellules NK, LB et LT par la technique de cytométrie en flux chez des patients LES .....	51
1.1. Stratégie de marquage et analyse des populations lymphocytaires et de cellules NK du sang périphérique issus de patients lupique.....	51

1.2. Quantification des cellules NK, LB et LT dans le sang périphérique des patients lupique versus individus sain.....	54
1.3. Discussion des résultats des immuno-marquage des cellules NK, LT et LB .....	61
2. Détection et quantification des auto-anticorps anti-nucléaire chez 25 patients LES ....	62
2.1. Etude épidémiologique .....	64
2.2. Détection des anticorps anti nucléaires par la technique d'Immunofluorescence indirecte sur la lignée de cellules humaine Hep2 .....	65
2.3. Dosage ELISA des Anticorps anti-nucléaires .....	69
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>75</b>

# Liste des Figures

Figure 1 : Lupus érythémateux systémique à début aigu : érythème en vesperilio du visage. .	5
Figure 2 : Représentation schématique de différents atteintes du lupus érythémateux systémique .....	7
Figure 3 : Schéma illustrant les différents facteurs favorisant le développement du LES.....	13
Figure 4 : Schéma générale des constituants du système immunitaire responsable des anomalies du système immunitaire dans le lupus.....	21
Figure 5 :Schéma représentatif de la maturation et différenciation des lymphocytes T.....	24
Figure 6 : Développement des lymphocytes B .....	27
Figure 7 : Schéma représentatif de la maturation antigène dépendant des lymphocytes B .....	28
Figure 8 : Activation des cellules B dans lupus érythémateux systémique. ....	30
Figure 9 : Schéma illustrant le principe de fonctionnement de la cytométrie en flux.....	40
Figure 10 : Fixation de l'auto anticorps à l'antigène.....	42
Figure 11 : Les étapes de l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur une lame de cellule Hep-2. ....	43
Figure 12 : Dépôt des échantillons et du contrôle sur la microplaque. ....	44
Figure 13 : Analyse des lames par microscope à fluorescence. ....	45
Figure 14 : lecteur de plaque Elisa .....	47
Figure 15 : Histogramme de représentation en nuage (Dot Plot) des cellules analysés par cytométrie en flux.....	51
Figure 16 : Diagramme représentant l'immuno-marquage des lymphocytes et cellules NK. ...	53
Figure 17 : Immuno-marquage des Lymphocytes T CD3 chez les patients versus contrôles..	55
Figure 18 : Immuno-marquage des Lymphocytes T CD3 chez les patients versus contrôles en fonction du sexe. ....	56
Figure 19 : Immuno-marquage des Lymphocytes B CD19 chez les patients versus contrôles. ....	57
Figure 20 : Immuno-marquage des Lymphocytes B CD19+ chez les patients versus contrôles en fonction du sexe.....	58
Figure 21 : Immuno-marquage des cellules Naturel Killer (NK) chez les patients versus contrôles. ....	59
Figure 22 : Immuno-marquage des cellules Naturel Killer (NK) chez les patients versus contrôles en fonction du sexe. ....	60
Figure 23 : Représentation de la répartition des patients lupique selon le sexe.....	64
Figure 24 : Histogramme représentant la répartition des patients par tranche d'âge.....	65
Figure 25 : Image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect d'homogène de la fluorescence.....	66
Figure 26 : Image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect moucheté..	66
Figure 27 : Image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect centromérique.....	67
Figure 28 : Image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect nucléolaire.....	67

Figure 29 : Histogramme représentant la répartition des aspects de la fluorescence des noyaux des cellules Hep2. ....	68
Figure 30 : Histogramme représentant les résultats du dosage Elisa des anticorps anti-nucléaires anti-ADNdb chez les patients lupique. ....	70
Figure 31 : Histogramme représentant la répartition des patients selon le type d'auto-anticorps. ....	71

## **Liste des tableaux**

Tableau I : Critères de classification de l' American College of Rheumatology. ....	9
Tableau II : Critères de classification du SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clonics) pour le lupus érythémateux systémique. ....	10
Tableau III: Incidence et prévalence de L.E.S dans différent payés . ....	12
Tableau IV : Gènes responsables de la susceptibilité au LES . ....	15
Tableau V : Degré d'activité de la maladie (indice de SLEDAI). ....	17
Tableau VI : Niveau d'activité défini selon le score SLEDAI. ....	19
Tableau VII : Panel d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochrome . ....	41
Tableau VIII : Tableau Résume les résultats d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA de nos patients : ....	62
Tableau IX : Représentation des différents aspects de fluorescence rencontrés en fonction des différents auto-anticorps évoqués des cellules Hep2 et pathologies associées. ....	69

# Liste des abréviations

AAN : Anticorps anti-nucléaire

AC : Anticorps

ACM : Anticorps monoclonaux

ACR : Américain College of Rhumatologie

ADN : Acide desoxyribonucleique

Ag : Antigène

Anti- RNP : Anticorps anti- nucléoprotéine

Anti -Ro/SSA: Anti-anticorps ribonucléoprotéique nucléaires soluble A

Anti -Sm: Anti-smith

ARNm: Acide rébonucléique messenger

BAFF : Facteur d'activation des cellules B

BCR: B-celle reseptor

BILAG : Indice du groupe d'évaluation du lupus des iles britanniques

CAMP : Piptide antimicrobien de cathelicidin

CD40L : Ligant CD40

Cellule NK : Cellule tueuse naturelle

Cellule Treg : Cellule régulatrice T

CI : Complexe immuns du lupus

CLP : Progéniteurs lymphocytaires communs

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CpG : Dinucléotide

CR1 :Complement receptor1

DC : Cellule dendritique

EDTA :Ethylène diamine tetra-acétique

FAN : Facteur antinucléaire

FCR : Récepteur du fragment Fc

GC: Glucocorticoïdes

Hep2 : Human epithelial cell line type 2

HLA: Human leukocyte antigen

IFI: Immunofluorescence indirect

IFN $\alpha$ : Interféron $\alpha$

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IV: Intraveineuse

LB: Lymphocytes B

LES: Lupus Erythémateux Systémique

MAI : Maladie auto-immune

Mdc : Cellule dendritique myéloïde

Netosis : Neutrophils extracellular traps

SLAM : Indice de la mesure de l'activité du lupus systémique

SLICC : Systemic lupus international collaborating clinics

SLEDAI-K : Indice de l'activité de la maladie de lupus érythémateux systémique - 2000

TCR: T-cell receptor

Th : Lymphocyte helper

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumour necrosis factor

UI: Unité internationale

# Résumé

Le Lupus Erythémateux Systémique (LES) est une maladie auto-immune, qui résulte d'une dérégulation du système immunitaire. Caractérisée par la production d'auto-anticorps et de complexes immuns, conduisant à une inflammation et des lésions tissulaires. Elle touche essentiellement les jeunes femmes. La survenue d'un LES est causée d'un terrain génétique, hormonal ou environnemental. L'objectif de ce travail est d'étudier la contribution des lymphocytes B dans LES. Dans un premier temps, nous avons réalisé une quantification des cellules NK et des lymphocytes B et T dans sang périphérique des patients lupiques et échantillons contrôle par la technique d'immunomarquage avec des anticorps spécifiques aux marqueurs de surface de chacune des populations, suivi d'une analyse par cytométrie en flux. Les résultats obtenus montrent une baisse significative du nombre des cellules NK, une augmentation considérable de la quantité des LT CD3 et une légère augmentation des LB CD19+ au niveau des patients lupique par rapport au contrôle sain. Ce qui nous a permis de dire que l'apport du lymphocyte B est dû à l'état excessif d'activation de ces cellules qu'à l'augmentation du nombre de la population.

Outre, pour le suivi de la contribution des lymphocytes B chez les patients lupique nous avons étudié la présence ou pas d'auto-anticorps anti-nucléaire (AAN) chez les patients et contrôle par la technique de microscopie à fluorescence indirecte sur la lignée cellulaire humaine Hep2. Les résultats obtenus montrent la présence d'auto-anticorps AAN chez l'ensemble des patients, caractérisée par la présence de la fluorescence d'un aspect homogène et un aspect de fluorescence moucheté. Pour déterminer la nature des auto-anticorps observée par IFI nous avons eu recours à la méthode ELISA qui nous a permis d'identifier ainsi que l'anticorps anti-SSA constitue le type d'anticorps le plus abondant suivi de l'anticorps anti-ADN et l'anticorps anti-Sm/RNP.

**Mots clés :** Lupus Erythémateux Systémique, lymphocytes B, auto-anticorps, cytométrie en flux, ELISA.

# Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease, characterized by loss of tolerance to self antigens resulting from the deregulation of the immune system. Hyperactive B cells are present in SLE patients leading to the production of auto-antibodies and immune complexes, leading to an inflammation and tissue injuries. This disease affects essentially the young women. The occurrence of SLE is resulted from a combination of genetic, hormonal and environmental factors. The mains of this work is to study the contribution of B lymphocytes in SLE. First, we quantified the NK cells B and T lymphocytes in peripheral blood of lupus (PBMC) of patients versus healthy controls by immunolabelling each population with specific antibodies directed against specific surface markers to each population, followed by flow cytometry analysis. Interestingly our results show a drastic reduction in NK cells population, a considerable increases of LT CD3 and small increase in B lymphocyte population within lupus patients compared to the controls. This allows us to say that the contribution of the B lymphocytes to the pathogenesis may be due attributed to the hyper-activation state of the B cells.

In addition to study the contribution of B lymphocytes in lupus patients, we monitored the presence or absence of anti-nuclear auto-antibodies (ANA) in patients versus controls by the indirect fluorescence microscopy strategy using human cell line Hep2. Our results shows the presence of ANA auto-antibodies in all the patients. Homogeneous fluorescence aspect and speckled fluorescence. To determine the nature of the auto-antibodies observed with IFI, we used ELISA to identify that the anti-SSA antibody is the most abundant type of auto-antibodies folowed by anti-Sm /RNP.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, B lymphocytes, auto-antibodies, flow cytometry, ELISA.

# Introduction générale

Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie chronique et multi-systémique inflammatoire touchant surtout la jeune femme, d'étiologie auto-immune évoluant par poussées, caractérisée par une importante production d'auto-anticorps et de complexes immuns, pouvant se déposer au niveau de différents organes cibles. Ces dépôts de complexes immuns conduisent à une inflammation et à des lésions tissulaires responsables de la grande diversité des manifestations cliniques de la maladie (Choi et al., 2012).

LES est une maladie qui touche toutes les populations du globe et toute les races, mais prédomine chez la femme entre l'âge de puberté et de la ménopause (période d'activité génitale), ce qui laisse supposer un rôle potentiel des facteurs hormonaux, plus particulièrement les œstrogènes. La race noire est particulièrement touchée avec une sévérité clinique plus importante (Kyttaris, 2010).

Le diagnostic de cette maladie peut être confirmé chez la majorité des malades par la découverte des anticorps dirigés contre les constituants du noyau cellulaire (ANA), LES est le prototype des maladies auto-immunes non spécifique d'organe et dont l'évaluation est spontanément grave.

De nombreux facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux (exposition à la lumière UV, des infections virales...etc.) influencent le développement de LES et ayant pour conséquence une réponse immune anormale avec une hyperactivité des lymphocytes T et B ainsi que la production d'auto-anticorps responsable de la destruction tissulaire soit par voie directe ou bien par dépôt de complexes immunes (Mok et Lau, 2003).

Elle constitue une maladie fréquente et grave, caractérisée par une multi-facette de ses atteintes ainsi que la gravité potentielle de certaines localisations notamment rénale et neurologique. Les traitements ont pour objectif de préserver les fonctions vitales des malades lors des poussées graves ;

s'opposer à l'évolution prévisible des atteintes viscérales, prévenir les poussées, et contrôler les symptômes afin d'améliorer la qualité de vie des patients (Moura Filho et al., 2014).

Ce présent travail s'intéresse à l'étude de la contribution des lymphocytes B dans les multiples dérégulations et dysfonctionnement du système immunitaire observés chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique. La dérégulation fonctionnelle du lymphocyte B est à l'origine de la production d'auto-anticorps et complexe immuns qui constituent les facteurs aggravateurs de la maladie du lupus.

# partie bibliographique

# Chapitre-I: Généralités sur LES

## 1. Définition de l'auto-immunité

L'auto-immunité ou maladies auto-immunes (MAI) résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants normaux de l'organisme (du soi). Dans le cas normal le système immunitaire permet de protéger l'organisme contre les agressions externes (bactéries, virus ...etc.), dans cas d'une maladie auto-immune, les mécanismes de tolérance sont défaillants, et des anticorps vont attaquer aux propres constituants des cellules de l'organisme : on les appelle des auto-anticorps qui vont conduire au déclenchement d'une maladie auto-immune. Cette dérégulation est due soit à la prolifération de lymphocytes B auto agressifs, ou bien aux lymphocytes T de forte affinité auto agressifs (Bonnotte, 2010).

Plusieurs facteurs responsables des maladies auto-immunes sont généralement d'origines héréditaires, par exemple la présence de polymorphismes aux niveaux des gènes HLA: human leukocyte antigen d'origine infectieuse ou induite par des toxines.

Les MAI sont classés en deux groupes : les maladies spécifiques d'un organe, et les maladies systémiques susceptibles de toucher tous les organes, comme c'est le cas de lupus érythémateux systémique (McGonagle et McDermott, 2006).

## 2. Définition du Lupus Érythémateux Systémique (LES)

Appelé aussi lupus érythémateux disséminé, est une maladie auto-immune, systémique et chronique caractérisé par l'atteinte du tissu conjonctif. Le terme lupus signifie « loup » en latin, ce terme est utilisé pour décrire les lésions ulcérentes du visage, semblable à une morsure de loup. Le mot érythémateux (rouge en grec) traduit la couleur rouge de l'éruption cutané. Cette maladie systémique peut affecter de nombreux organes et notamment la peau, les reins, les articulations, les poumons et le système nerveux, avec des manifestations extrêmement variées (Scofield et Oates, 2009).

Dans le cas d'un LES on observe une perte de la tolérance aux molécules du soi caractérisée par la production d'auto-anticorps, exemple: anticorps anti-nucléaire (ANA), formation de complexe immuns, production de IFN alpha, apparition de l'inflammation au niveau tissulaire, destruction des tissus et atteintes de différents organes (Moura Filho et al., 2014).

### 3. Aspects clinique

Les symptômes varient d'une personne à l'autre, sont liés par rapport à l'âge et changent au cours de l'évolution de la maladie (Crow et al., 2015, Oke et Wahren-Herlenius, 2013).

#### 3.1. Manifestation cutanée

Les manifestations cutanées du lupus affectent environ 80% des malades, et peuvent être présentés dès le début de la maladie. Ces signes se présentent souvent avec des lésions rouges sur la peau, au niveau du visage et d'autres lésions apparaissent couramment sur les mains, les coudes et le décolleté. La peau devient très sensible au soleil qui provoque pendant l'exposition des éruptions cutanées chronique apparaissent sur la face, le cuir chevelu, les oreilles ; le centre de cette lésion peut apparaître comme une cicatrice blanchâtre et peut aussi entraîner une perte de cheveux dans certains cas (Cojocar et al., 2011).



**Figure-1** : Lupus érythémateux systémique à début aigu : érythème en vespertilio du visage.

#### 3.2. Manifestation articulaires :

Atteinte articulaire est présentée par des douleurs des articulations et une inflammation de ces derniers qui deviennent rouges, chaudes et gonflées. Les petites articulations tel que les doigts, les

poignets et les orteils sont les plus touchés accompagnés de douleur aussi sous l'effet du froid et le stress et les muscles aussi peuvent être douloureux. En général, pas de destruction articulaire.

### **3.3. Manifestation pulmonaire:**

Cette manifestation est caractérisée par une toux ou une difficulté à respirer. Certains malades souffrent d'une inflammation de l'enveloppe qui entoure les poumons, y aura aussi apparition de liquide autour des poumons qui peut causer une douleur au thorax qui s'aggrave à la respiration (Cojocar et al., 2011).

### **3.4. Manifestation vasculaire :**

Elle se traduit par le phénomène de RAYNAUD qu'est une mauvaise circulation au niveau des extrémités des doigts, caractérisée par le changement de couleur des pointes des doigts et des orteils.

Il peut y avoir aussi des cas grave tel que thrombose qui se produit par formation d'un caillot de sang dans les veines qu'est liée à la présence des auto-anticorps anti phospholipides.

### **3.5. Manifestation rénale :**

C'est l'atteinte la plus grave du LES ; Généralement survient après apparition des manifestations articulaires, cutanées, pulmonaires ou cardiaque. Cette atteinte est détectée par des tests d'urines et l'anomalie la plus fréquente c'est l'excès des protéines dans les urines ou bien la présence du sang et aussi des globules blancs sans présence d'infection ; et dans d'autres cas, cette atteinte peut être découverte par une hypertension artérielle (Manson et Rahman, 2006). Par ailleurs, il arrive que le patient puisse perdre complètement son rein.

### **3.6. Manifestation sanguine :**

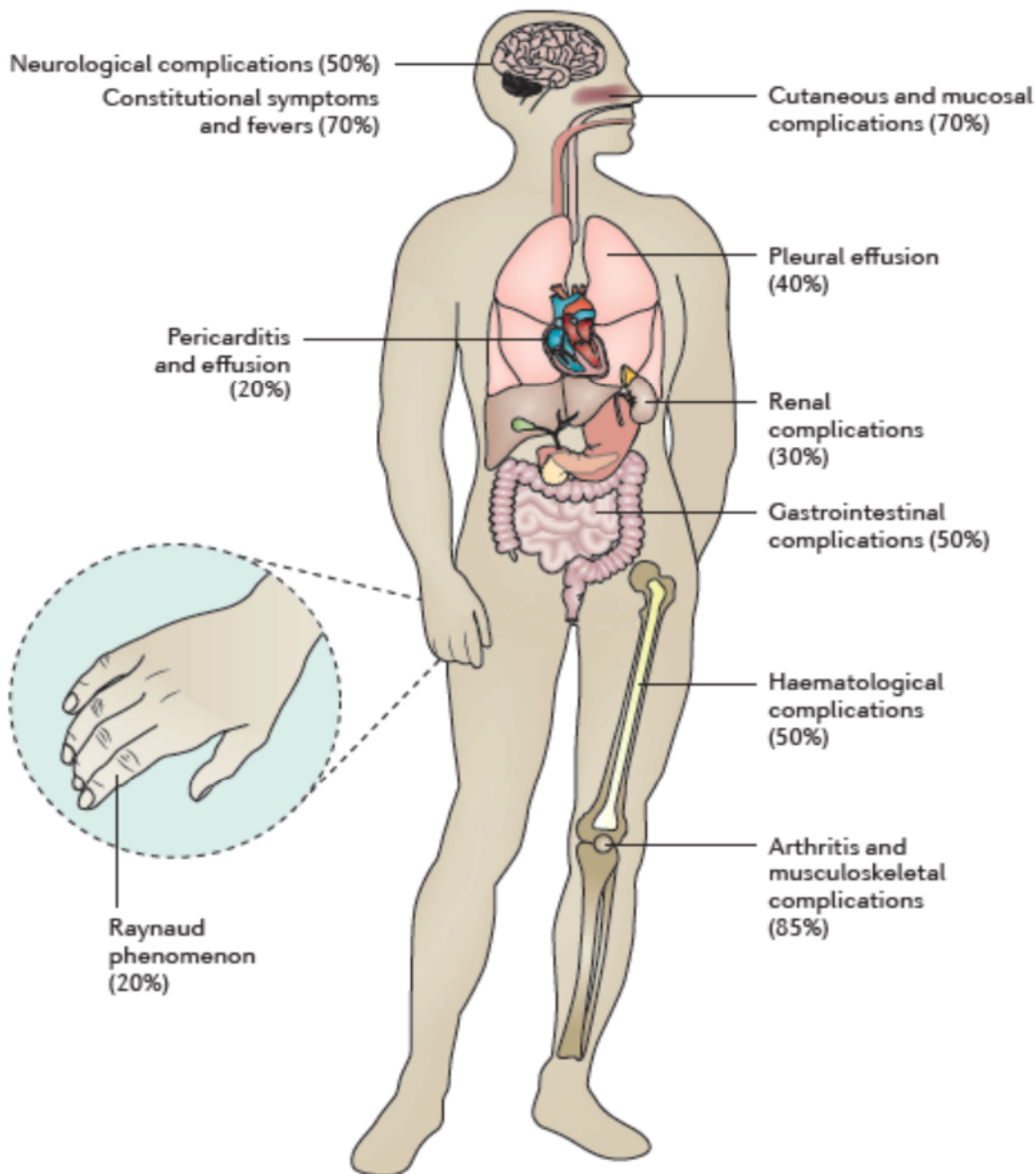
La manifestation sanguine est appelée aussi hématologique, elle est caractérisée par une anémie, une diminution des globules blancs ou les plaquettes.

### **3.7. Manifestation neurologique :**

Elle est observée chez les patients atteints de LES à longue durée ; Est caractérisée par des maux de tête dus au stress. Et aussi dans des cas plus rarement, les patients peuvent présenter des convulsions, une paralysie transitoire ou des mouvements anormaux, peut aussi arriver à des stades de dépression et des problèmes de mémoire.

### 3.8. Manifestation digestive :

C'est une atteinte digestive inflammatoire : soit une hépatite, pancréate ou bien une péritonite (Manson et Rahman, 2006).



**Figure-2** : Représentation schématique de différentes atteintes du lupus érythémateux systémique (Kaul et al., 2016). La nature à multiples facettes du LES est montrée par le nombre de différents systèmes d'organe qui peuvent être affectés. Entre autre, chaque complication d'organe-spécifique peut se manifester de différentes manières par exemple, les complications cardiaques peuvent être la conséquence de la myocardite, de péricardite et d'effusion de sang .En effet, 20% des patients touchés pas la maladie de Lupus en souffrent ; la péricardite est une inflammation de la membrane qui enveloppe le cœur. Les complications vasculaires ainsi que le phénomène de Raynaud se

caractérisant par une coloration de la pointe des doigts et des orteils dû à une mauvaise circulation sanguine visent 20% des malades. D'autres complications peuvent également apparaître telles que les complications neurologiques, sanguines et gastro-intestinales (la participation gastro-intestinale varie des ulcères oraux à la véritable entérite et à l'ascite de lupus) touchent 50% des malades. Plus de la moitié d'entre eux souffrent de symptômes constitutionnels, de fièvres, de complications cutanées des muqueuses ces patients représentent 70% des malades. Néanmoins d'autres complications peuvent touchées les patients même s'ils sont moindre (40% d'épanchement pleural, 30% de complications rénales). Les manifestations les plus importantes chez les patients atteints du Lupus restent les complications musculaires comme l'arthrose qui touchent près de 85% des patients.

## **4. Diagnostic et critères de classification**

Le Lupus est une pathologie extrêmement hétérogène ce qui a rendu difficile la recherche et développement de traitement spécifique. En raison de la diversité des symptômes, Le diagnostic du LES est souvent difficile et long (Kaul et al., 2016). Les médecins établissent le diagnostic à partir de l'évaluation des manifestations cliniques combinés aux analyses biologiques (résultats des analyses de sang).

### **4.1. Critères de classification**

Il existe plusieurs types de classification du lupus tel que les critères de Fries publié en 1975, la classification de l'ACR établit en 1982 et révisé en 1997 par la Société Américaine de Rhumatologie, "American College of Rheumatology". enfin une nouvelle classification établie par le groupe "The Systemic Lupus International Collaborating Clinics" (SLICC) (Petri et al., 2012), qui intègre les connaissances les plus récentes sur le LES. Cette classification atteint une sensibilité évaluée à 94%. La Société Américaine de Rhumatologie, "American College of Rheumatology" (ACR) a publié une liste révisée en 1997 de 11 critères internationaux (Tableau I), font référence dans le monde pour diagnostiquer la maladie, parmi ces onze critères, sept sont d'ordre clinique et quatre sont d'ordre biologique (Kaul et al., 2016).

**Tableau I** : Critères de classification de l'American College of Rheumatology (Kaul et al., 2016).

Critères cliniques	Critères biologiques
<p><b>1</b> Eruption malaire en ailes de papillon.</p> <p><b>2</b> Lupus discoïde (lésion cutanée apparait sur la face, cuir chevelu, les oreilles, poitrine, ou les bras après exposition au soleil).</p> <p><b>3</b> Photosensibilité</p> <p><b>4</b> Ulcérations buccales ou nasopharyngées</p> <p><b>5</b> Polyarthrite non érosive</p> <p><b>6</b> Pleurésie ou péricardite (sérite)</p> <p><b>7</b> Atteinte neurologique (Convulsions ou psychose)</p>	<p><b>8</b> Atteinte rénale (Protéinurie &gt; 0,5 g/24h ou cylindres urinaires)</p> <p><b>9</b> Atteinte hématologique :            - Anémie hémolytique            - Ou leucopénie &lt; 4000/<math>\mu</math>L            - Ou lymphopénie &lt; 1500/<math>\mu</math>L            - Ou thrombopénie &lt; 100 000 /<math>\mu</math>L</p> <p><b>10</b> Désordre immunologique : présence anticorps anti-ADN natif ou anti-Sm ou sérologie syphilitique faussement positive ou titre anormal d'anticorps anti-cardiolipine ou présence d'un anticoagulant circulant</p> <p><b>11</b> Présence d'un titre anormal d'anticorps anti-nucléaires</p>

En 2012, le groupe « SLICC » a proposé de nouveaux critères de classification (Tableau II), plus sensibles, qui reprennent les critères de l'ACR en détaillant et introduisant la nécessité de la présence de 4 critères (dont au moins un critère clinique et un critère Immunologique) pour établir la présence d'un lupus.

**Tableau II :** Critères de classification du SLICC (Systemic Lupus International collaborating Clonics) pour le lupus érythémateux systémique (Petri et al., 2012).

	<b>Critères de classification</b>	<b>Détails</b>
<b>Critères cliniques</b>		
1	Lupus cutané aigu ou subaigu	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rash malaire</li> <li>-Lupus bulleux</li> <li>-Nécrolyse épidermique toxique</li> <li>-Rash maculopapuleux</li> <li>-Rash dans le cadre d'une photosensibilité</li> <li>-Lésion psoriasiforme</li> <li>-Lésion annulaire polycyclique</li> </ul>
2	Lupus cutané chronique	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rash discoïde</li> <li>-Lésion verruqueuse</li> <li>-Panniculite lupique</li> <li>-Lupus tumidus</li> <li>-Lupus engelure</li> <li>-Lésion type lichen plan</li> </ul>
3	Ulcères muqueuse orale ou nasale	Palais buccal, langue, nez
4	Alopécie non cicatricielle	Eclaircissement diffus de la chevelure ou fragilité capillaire avec mise en évidence de cheveux cassés.
5	Synovite impliquant plus de deux articulations	Caractérisé par un gonflement ou une effusion
6	Sérite	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pleurisie typique pour plus d'un jour</li> <li>-Douleur pericardiaque typique pour plus d'un jour</li> </ul>
7	Atteinte rénale	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Rapport protéinurie /Créatinine urinaire présente 500mg de protéine/24h</li> <li>-mélange</li> </ul>
8	Atteinte neurologique	Épilepsie, psychose, mononévrite, myélite, neuropathie périphérique, état confusionnel aiguë
9	Anémie hémolytique	
10	Leucopénie	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Leucocytes &lt; 4 000/mm<sup>3</sup></li> <li>- Lymphocytes &lt; 1 000/mm<sup>3</sup></li> </ul>
11	Thromb Thrombopénie	-Thrombopénie < 100 000/mm <sup>3</sup>

<b>Critères immunologiques</b>		
1	Anticorps anti-nucléaires ANA	Niveau Anticorps anti-nucléaires supérieure à la norme du laboratoire
2	Anticorps anti ADN natif	Niveau Anticorps anti ADN natif supérieure à la norme du laboratoire
3	Anti-Sm	Présence d'anticorps contre antigène nucléaire Sm
4	Anticorps anti phospholipides	
5	Complément abaissé	Diminution des compliments C3, C4, CH50
6	Test de Coombs direct positif	En absence d'anémie hémolytique

## **5. Epidémiologie**

Le Lupus érythémateux systémique est une maladie globale liée à un grand risque de mort prématuré. Le nombre de personne atteinte de LES entre l'âge du début de la maladie jusqu'au risque de mortalité varie considérablement entre les pays. La meilleure information que nous avons sur l'incidence, prédominance, les résultats de mortalité parviennent d'Europe et d'Amérique du Nord ; moins de données sont fournies d'Afrique et d'Australie voir Tableau III (Kaul et al., 2016). LES est 9 fois plus fréquent chez les femmes que chez les hommes pendant l'âge reproductive mais seulement 2 à 3 fois plus fréquent pendant l'enfance ou après 65 ans. Le lupus affecte les femmes en particulier entre l'âge de la puberté et la ménopause. Les personnes d'origine africaine, en particulier ceux qui ont migré en Amérique du Nord ou l'Europe, ont une incidence et une prédominance plus élevées de la maladie et un plus jeune âge de risque que ceux d'origine d'Europe du Nord. Il y a une incidence élevée de LES chez les personnes de race noires (Flower et al., 2012, Yee et al., 2015).

Dans une étude Tunisienne, l'âge moyen d'apparition du lupus est d'environ 30 ans chez les femmes et 31 ans pour les hommes. Quant au Maroc, la maladie survient en moyenne 10 ans plus tard qu'en Tunisie, à environ 40 ans pour les femmes un âge plus jeune que les hommes qui voient apparaître la maladie au alentour de 41 ans.

**Tableau III:** Incidence et prévalence de L.E.S dans différent payés (Kaul et al., 2016).

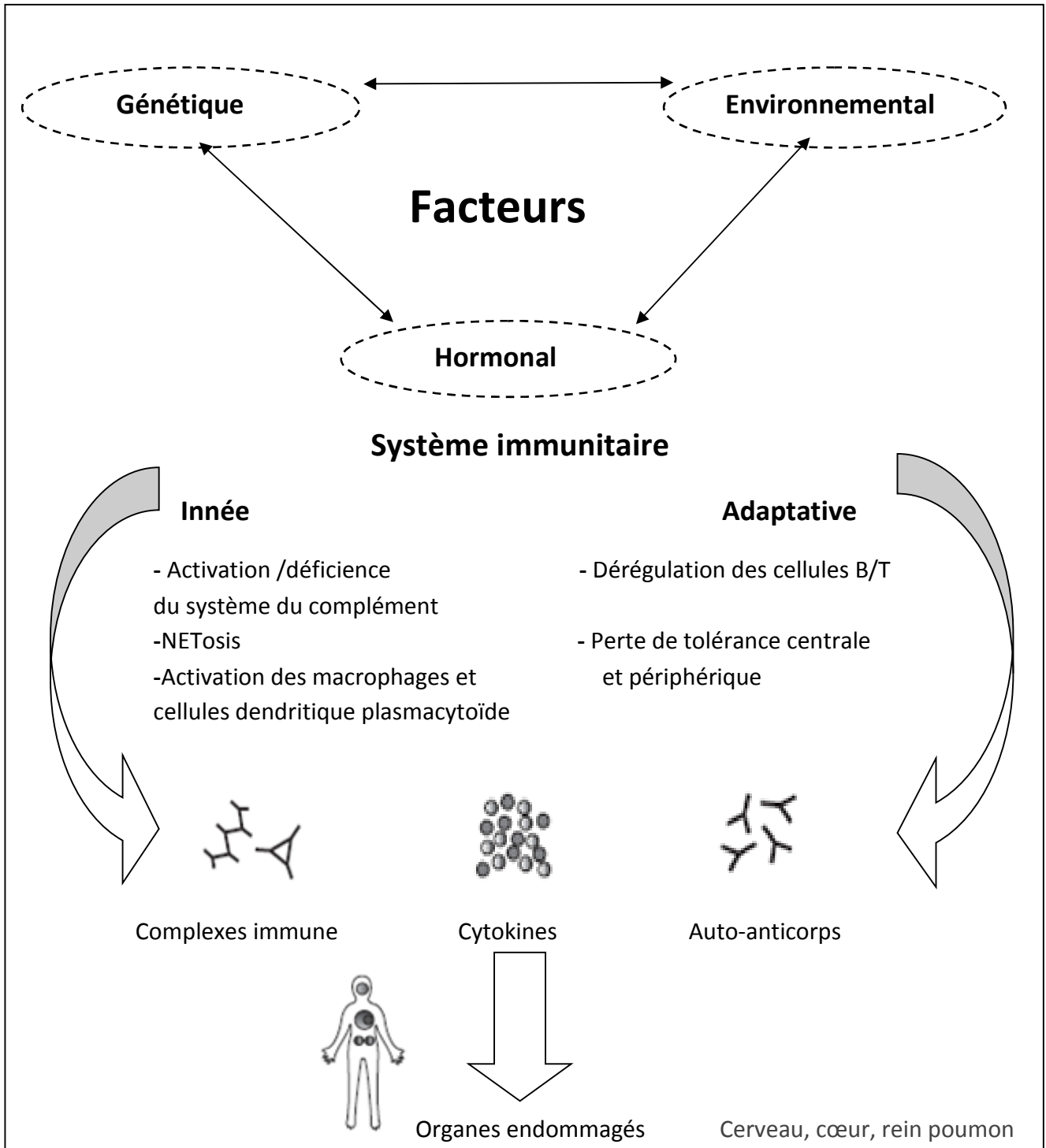
PAYS OU POPULA TION	Incidence (per 100,000)			Prévalence (per 100,000)				
	Totale	Femme	Homme	Totale	Femme	Homme	Population noir	Populatio n blanche
<b>Etats Unis (Géorgie)</b>	5,6	9,2	1,8	73	128	15	119	33
<b>Etats Unis (Michigan )</b>	5,5	9,3	1,5	73	129	13	112	48
<b>Barbade</b>	NA	12,2*	0,8*	NA	153*	10*	NA	NA
<b>Danemar k</b>	1	NA	NA	28	NA	NA	NA	NA
<b>Royaume -Uni</b>	4 ,6	7,8	1 ,3	88	152	22	525*	124
<b>Service de sante Indien américain</b>	7,4	10,4	NA	178	271	54	NA	NA
<b>Taiwan</b>	4,9≠	NA	NA	98≠	NA	NA	NA	NA
<b>Corée</b>	NA 2,5≠	NA NA	NA NA	19- 22≠ 27≠	NA NA NA	NA NA NA	NA NA NA	NA NA NA
<b>Australie</b>	NA	NA NA	NA 45	NA NA	NA NA	NA NA	74§ 93	19 NA

NA =Not avaiable (non-disponible), \*La majorité de cette étude a été réaliser sur une population noire d'origine africaine-caraïbienne. ≠Origine chinoise. §Indigène d'Australie.

## 6. Les causes

Lupus érythémateux systémique est causé par altération du système immunitaire, dont le fonctionnement normale est de défendre l'organisme contre les agressions extérieures. Dans le cas de Lupus le système immunitaire ne reconnait plus les constituant du corps de la personne et donc produit des auto-anticorps qui s'attaquent à ses propres tissus.

L'origine exacte de ce dérèglement reste à nos jours inconnus, mais plusieurs facteurs pourraient entrer en jeu.



**Figure-3** : Schéma illustrant les différents facteurs favorisant le développement du LES.

## 6.1. Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques sont importants dans la physiopathologie du LES, en effet, des études ont montrés que chez les jumeaux monozygotes la concordance n'est que de 50 %, ce qui veut dire qu'un vrai jumeau à 50 % de risques de développer un lupus si son jumeau en souffre. Par contre, chez les jumeaux dizygotes (faux jumeaux), le risque d'avoir un lupus est majoré seulement à 5% (Mathian et al., 2014).

La présence de quelques mutations monogénique sur un certain nombre de gènes du complexes majeur d'histocompatibilité (CMH) semblent contribue à l'apparition de la maladie. Les gènes HLA de classe II ont également été associés à la présence de certains auto-anticorps tels que l'anti-Sm, anti-Ro, anti-La, anti-nRNP et anticorps anti-ADN (Ramos et al., 2010).

Ainsi que les déficits en un des composants précoces de la cascade du complément (C1q, C2, C4). Le déficit en C1q est responsable d'une diminution de la clairance des corps apoptotiques et des complexes immuns avec l'accumulation d'auto-antigènes lupiques. Le déficit en c4 est associé à une altération de la déplétion des lymphocytes B auto-réactifs (Mathian et al., 2014).

En outre, de nombreux autres gènes polymorphes sont associés à l'apparition de la maladie, ces gènes codent pour ; la protéine de liaison au mannose (MBP), le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ , le récepteur des cellules T, l'interleukine 6 (IL-6), CR1 (complement receptor type 1), les allotypes d'immunoglobuline Gm et Km, Fc $\gamma$ RIIA et Fc $\gamma$ RIIIA (tous deux sont des récepteurs au Fc de IgG) (Mok et Lau, 2003). Donc cela explique que LES démeure une maladie polygénique.

**Tableau IV :** Gènes responsables de la susceptibilité au LES (Mok et Lau, 2003).

<b>les gènes responsable de la susceptibilité au LES.</b>
Les gènes HLA
DR2, DR3 (risque relatif de 2à5)
DR2, DR3, DQw1, DQw2, DQA1, DQB1, B8 (anti-Ro)
DR3, DR8, DRw12 (anti-La)
DR3, DQw2, DQA1, DQB1, B8 (anti-Ro et anti-La)
DR2, DR3, DR7, DQB1 (anti-ADN)
DR2, DR4, DQw5, DQw8, DQA1, DQB1 (anti-U1 protéineribonucléaire)
DR2, DR4, DR7, DQw6, B61 (anti-Sm)
DR4, DR7, DQ6, DQ7, DQw7, DQw8, DQW9 (lupus anticoagulant)
Système du compliment (C1q, C2, C4)

## **6.2. Facteurs hormonaux**

La maladie touche essentiellement les femmes en période d'activité génital, ce qui laisse supposer un rôle potentiel des hormones sexuelles endogènes dans la prédisposition de la maladie, et plus particulièrement les œstrogènes.

Les concentrations physiologiques des œstrogènes facilitent les réponses humorales, conduisant à une augmentation de la prolifération des cellules B et à la production d'anticorps, Au contraire des doses élevées d'œstrogènes inhibent les réponses des cellules T, tel que la prolifération et la production d'interleukine 2 (IL-2), augmente également les niveaux des ARNm codant pour la calcineurine. Ces effets semblent spécifiques aux patients atteints de LES, ce qui indique que les lymphocytes T lupiques sont plus sensibles aux œstrogènes (Mok et Lau, 2003).

Les œstrogènes peuvent aggraver le SLE en prolongeant la survie des cellules auto-immunes, en augmentant la production de cytokines de type 2 (Th2) et enfin en stimulant les cellules B pour

produire des auto-anticorps. L'inhibition de la réponse Th1 et l'amélioration de l'expression de CD40L sur les lymphocytes T lupiques peuvent favoriser indirectement la réponse Th2 et conduire à une hyperactivité supplémentaire des lymphocytes B (Mok et Lau, 2003).

### **6.3. Facteurs environnementaux**

Certains facteurs externes favorisent le développement du lupus systémique :

L'exposition au soleil (plus particulièrement aux rayons UV) favorise l'apoptose des kératinocytes et l'excès de production des corps apoptotiques. Une infection récente avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) pourrait bien jouer un rôle dans le déclenchement de la maladie, en raison de la ressemblance des antigènes du virus avec les auto-antigènes SSA et Sm (antigène du soi). La prise de certains médicaments tel que l'hydralazine et le procainamide sont responsables de lupus induit, inhibent la méthylation de l'ADN, et modifiait l'expression de plusieurs gènes. La silice et les infections microbiennes jouent également un rôle d'activateur polyclonal du système immunitaire (Kyttaris, 2010).

## **7. Le système des scores (SLEDAI-K2)**

La mesure de l'activité de la maladie « lupus érythémateux systémique » est essentielle pour la recherche clinique lors de l'évaluation des résultats cliniques, en comparant les différences significatives des patients atteints de LES, en évaluant l'activité de la maladie par des essais cliniques (Mikdashi et Nived, 2015).

Le cours évolutif du lupus s'est amélioré ces dernières décennies, grâce à la meilleure connaissance de la pathogénie ainsi que ses manifestations cliniques, à l'évolution des méthodes diagnostiques et thérapeutiques, et à la prévention des différentes complications notamment infectieuses et cardiovasculaires sans oublier l'éducation thérapeutiques et l'implication des patients dans la prise en charge de la maladie.

Au sein des maladies systémiques, le LES est la maladie pour laquelle le plus grand nombre d'essais thérapeutiques ont été et sont toujours conduits. Ainsi, de nombreux scores d'activité ont été proposés (BILAG, RIFLE ...et SLEDAI-K). Le score dont l'utilisation est extrêmement répandue dans l'évaluation de la gravité du lupus est le SLEDAI-k2 (SLEDAI-2000) quia été introduit en 2002

comme une mesure de l'activité de la maladie à l'échelle mondiale (Yee et al., 2011). SLEDAI-2 K est une modification de la SLEDAI originale qui permet la documentation de l'activité persistante de la maladie dans les descriptions : éruption cutanée, alopecie, ulcères muqueux et protéinurie (Mikdashi et Nived, 2015).

**Tableau V** : Degré d'activité de la maladie (indice de SLEDAI) (Seror, 2012).

Score	Manifestations	Définition
8	Convulsion	Apparition récente, exclusion des causes métaboliques, infectieuses ou médicamenteuses
8	Psychose	Perturbation de l'activité normale en rapport avec une altération sévère de la perception de la réalité. Comprend : hallucinations, incohérence, appauvrissement du contenu de la pensée, raisonnement illogique, comportement bizarre, désorganisé ou catatonique. Exclusion d'une insuffisance rénale ou d'une cause médicamenteuse.
8	Atteinte Cérébrale	Altération des fonctions mentales avec troubles de l'orientation, de la mémoire ou autre d'apparition brutale et d'évolution fluctuante. Comprend : troubles de la conscience avec réduction des capacités de concentration, incapacité à rester attentif avec en plus 2 au moins des manifestations suivantes : troubles perceptifs, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice.
8	Troubles visuels	Atteinte rétinienne du lupus. Comprend : nodules dysoriques, hémorragies rétiniennes, exsudats séreux ou hémorragies choroïdiennes, névrite optique. Exclusion d'une cause hypertensive, infectieuse ou Médicamenteuse
8	Nerfs crâniens	Neuropathie sensitive ou motrice d'apparition récente touchant un nerf crânien
8	Céphalées	Céphalées sévères et persistantes, pouvant être migraineuses mais résistants aux antalgiques majeurs.
8	AVC	Accident vasculaire cérébral d'apparition récente. Artériosclérose exclue.
8	Vascularite	Ulcérations, gangrène, nodules digitaux douloureux,

		infarctus périunguéaux ou preuve histologique ou artériographie de vascularite
4	Arthrites	Plus de 2 articulations douloureuses avec des signes inflammatoires locaux (douleur, tuméfaction ou épanchement Articulaire
4	Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale associée à une élévation des CPK et/ou aldolases ou à des modifications électromyographiques ou à une biopsie montrant des signes de vascularite.
4	Cylindres Urinaires	Cylindres de globules rouges
4	Hématurie	> 5 g/champ en l'absence de lithiase, d'infection ou d'une autre cause.
4	Protéinurie	> 0,5 GR/24 heures. Apparition récente ou majoration récente de plus de 0,5 g/24 heures.
4	Pyurie	> 5 GB/champ en l'absence d'infection.
2	Nouveau rash	Apparition récente ou récurrence d'un rash cutané Inflammatoire
2	Alopécie	Apparition récente ou récurrence d'une alopécie en plaques ou diffuse.
2	Ulcères muqueux	Apparition récente ou récurrence d'ulcérations orales ou nasales.
2	Pleurésie	Douleur thoracique d'origine pleurale avec frottement ou épanchement ou épaissement pleural.
2	Péricardite	Douleur péricardique avec au moins l'une des manifestations suivantes : frottement, épanchement ou confirmation électrographique ou échographique
2	Complément	Diminution du CH50, du C3 ou du C4 < la normale inférieure du laboratoire.
2	Anti-ADN	Positivité > à 25% par le test de Farr ou taux > à la normale du laboratoire.
1	Fièvre	> 38 °C en l'absence de cause infectieuse.

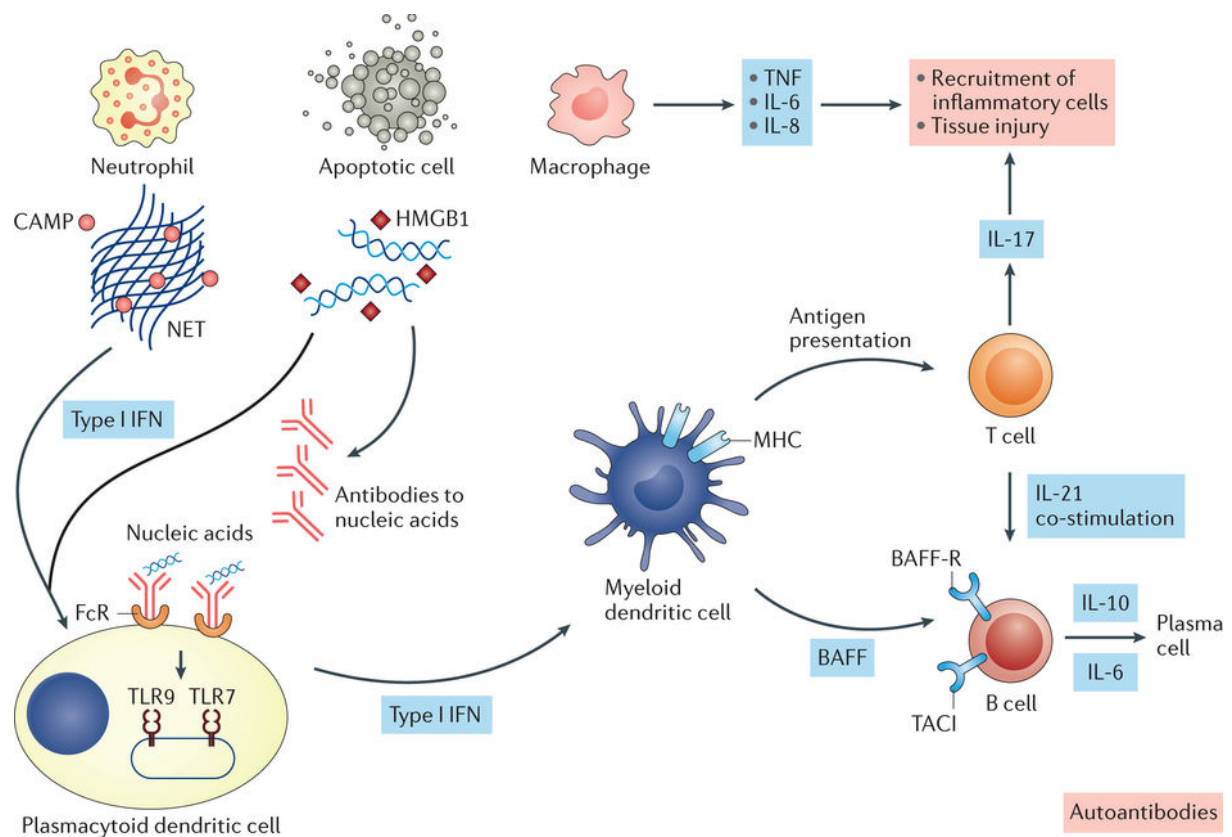
<b>1</b>	Thrombopénie	< 100 000 plaquettes/mm <sup>3</sup> .
<b>1</b>	Leucopénie	< 3 000 GB/mm <sup>3</sup> en l'absence de cause médicamenteuse.

**Tableau VI** : Niveau d'activité défini selon le score SLEDAI (Seror, 2012).

Score SLEDAI	Niveau d'activité
SLEDAI = 0	Pas d'activité
SLEDAI entre 1 et 5	Activité légère
SLEDAI entre 6 et 10	Activité moyenne
SLEDAI entre 11 et 19	Activité élevée
SLEDAI $\geq$ 20	Très haute activité

## **Chapitre-2: Immunobiologie**

La fonction normale du système immunitaire est de protéger l'organisme contre les agressions extérieures (Chaplin, 2010), mais dans le cas du lupus érythémateux systémique (LES) qui est une maladie auto immune, les cellules immunitaires s'attaquent aux tissus qu'ils sont censées protéger. La physiopathologie de cette maladie est due à plusieurs facteurs dont la susceptibilité génétique, où les gènes de prédisposition contribuent au développement du lupus. L'apparition de dérégulation du système immunitaire contribue en faveur du développement de cette affection (Tsokos, 2016). La dérégulation du système immunitaire lors du Lupus est responsable de la perte de tolérance aux molécules du soi qui se manifeste par des atteintes tissulaires sous l'effet de l'activation anormales des composants du système immunitaire inné et adaptatif entraînant les différentes atteintes d'organes observés dans le lupus (Ramanujam and Davidson, 2008).



**Figure-4** : Schéma générale représentant les constituants du système immunitaire responsable des anomalies présentes dans le lupus (Tsokos et al., 2016). Les neutrophiles et les cellules apoptotiques sont au sommet de la cascade de mécanismes pathogénique dans le lupus. Ils proviennent essentiellement des ligands pour conduire l'expression des interférons de type 1. Les neutrophiles représentent un facteur inflammatoire principal aux dommages d'organes. Ces cellules libèrent également les pièges extracellulaires de neutrophile, une source de citrullination des antigènes des peptides nucléique, par l'intermédiaire de NETosis (Neutrophile Extra cellulaire Traps). Beaucoup de cellules produisent les interférons de type 1 mais les cellules dendritiques plasmacytoïde produisent des quantités plus élevées de ces cytokines. Les débris apoptotiques peuvent également activer l'expression de cytokines inflammatoires qui participent au recrutement des cellules dans les tissus. Les cellules T et les cellules B toutes les deux participent à l'auto-réactivité, avec des cellules B produisant des auto-anticorps. La production de l'IL-17 par les cellules T contribue à l'infiltration d'organes par les neutrophiles. BAFF, le facteur d'activation de cellule B via son récepteur à BAFF. CAMP, peptide antimicrobiens de cathelicidin. FcR, récepteur au fragment Fc. CMH, complexe majeur d'histocompatibilité. TACI, activateur transmembranaire et ligand de cyclophilin. TLR, Toll-Like Récepteur.

## 1. La dérégulation des fonctions des cellules du système immunitaire innée dans le lupus

Le LES est caractérisé par une dérégulation du système immunitaire et une hyperactivité des cellules B et T amenant à la production des auto-anticorps dirigés contre plusieurs auto-antigènes (Ramanujam et Davidson, 2008). Les complexes immuns formés activent le

système immunitaire par la voie classique du complément et les cellules du système immunitaire naturel : macrophage, cellule dendritiques ...etc.

### **1.1. Neutrophiles**

Les neutrophiles et les plaquettes sanguines semblent jouer un rôle important, via notamment la production de microparticules. En effet, les microparticules sont impliquées par l'intermédiaire de divers mécanismes dans la pathogénie de lupus, en étant comme source d'auto-antigènes, via la formation des complexes immuns, mais également dans la présentation antigénique aux lymphocytes T (Tsokos, 2011).

### **1.2. Macrophages**

Les macrophages sont majoritaires dans les infiltrats des lésions de LES. Ils sécrètent de l'IL-6 qui permet la prolifération et différenciation des LB, de l'IL-8 puissant agent chimiotactique, de l'IL-1 et TNF qui joue un rôle important dans l'inflammation. Ils permettent également une stimulation de l'adhérence des leucocytes à l'endothélium en augmentant l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Ils sont aussi capables de phagocyter la myéline (Mantovani et al., 2004).

### **1.3. Cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) qui existent sous deux formes : les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les cellules myéloïdes. Le réseau des cellules dendritiques plasmacytoïdes est activé par la présence des complexes immuns et sécrètent de grande quantité d'interféron alpha. Ce dernier, est capable d'induire la différenciation des monocytes circulants en cellules dendritiques myéloïdes dont le rôle consiste à capter l'antigène et à le présenter aux cellules T CD4 et aux cellules B productrices des auto-anticorps (Banchereau et Pascual, 2006).

### **1.4. Cellules NK**

Il a été suggéré mais non formellement démontré ; qu'au cours du Lupus systémique des facteurs sériques sont associés à la diminution de l'activité des cellules NK. Des corrélations statistiques et des effets immunologiques directs suggèrent que l'IFN $\alpha$  ; plutôt que des auto-anticorps ( sous formes de complexes immuns circulant) pourra jouer un rôle majeur.

Ainsi les principales études ont porté sur les associations KIRS/ HLA-I ; c'est-à-dire sur une influence potentielle et de l'activation de la cytotoxicité des cellules NK de type (missing self recognition) au cours des maladies auto-immunes. Ceci fut mis en évidence pour

certaines maladies auto-immunes par contre ; certaines études ont montrées la présence des prédispositions génétiques qui puissent expliquer les défauts qualitatifs de ces cellules NK. Ainsi différentes anomalies génétiques ont été mises en évidence. Elles sont d'ordres génotype alléliques ou liées à des polymorphismes. Elles concernent différents récepteurs et voies de signalisation impliqués dans des voies d'activation particulières des cellules NK : reconnaissances de type (missing self recognition) ; cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et stress-induced recognition (Schleinitz et al., 2010).

## **2. Les cellules de la réponse immunitaire adaptative et lupus**

Il s'agit des cellules B et cellules T ont une morphologie similaire avec un rapport nucléocytoplasmique très élevé. Ces cellules sont capables de reconnaître spécifiquement les agents pathogènes et sont responsable de l'immunité à médiation humorale et immunité à médiation cellulaire respectivement.

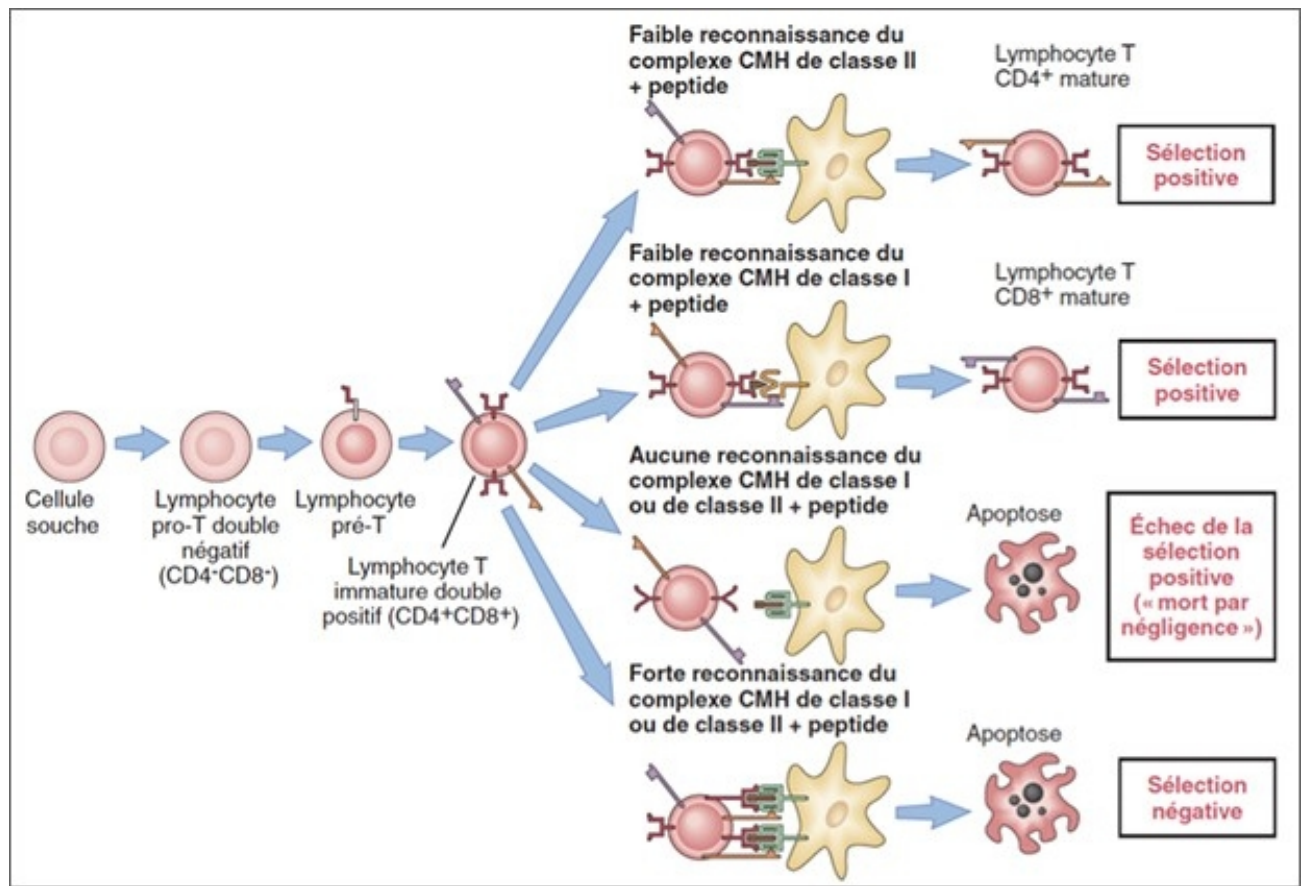
### **2.1. Lymphocytes T**

Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire.

Les lymphocytes T représentent 80% des lymphocytes circulant dans le sang. Cette catégorie de globules blancs est produite dans le thymus avant de se différencier en thymocytes matures. Ils se transforment en cellules tueuses et détruisent toutes les cellules reconnues comme étrangères.

Il existe deux principaux types de lymphocytes T, les CD4 auxiliaires et CD8 cytotoxique. En complément avec cette distinction entre CD4 et CD8. Il existe également différentes sous-population de LT CD4 (Th1, Th2, Th17, Th9, LTreg) dont le développement est contrôlé par divers facteurs de transcription. Ces sous types sont finement spécialisés et sécrètent des cytokines spécifique.

La maturation des cellules T se déroule dans le thymus suivant différentes étapes successives, à partir des cellules souches hématopoïétique ayant migrées de la moelle osseuse vers thymus. Elles génèrent les lymphocytes pro-T, dites double négatif car n'expriment pas encore de CD4 ni CD8. La maturation des cellules T passe par l'étape du lymphocyte double positif exprimant à la fois le CD4 et le CD8.



**Figure-5** : Schéma représentatif de la maturation et différenciation des lymphocytes T.

La Figure 5 montre la maturation des cellules T se déroulant dans le thymus suivant différentes étapes successives, à partir des cellules souches hématopoïétique ayant migrées de la moelle osseuse vers thymus. Elles génèrent les lymphocytes pro-T, dites double négatif car n'expriment pas encore CD4 ni CD8.

. La suite de la maturation des cellules T passe par l'étape du lymphocyte double positif exprimant à la fois CD4 et CD8.

S'ensuit la phase de sélection des lymphocytes par présentation du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) avec le récepteur du lymphocyte T :

- Les lymphocytes T dont les récepteurs reconnaissent les complexes CMH de classe I conservent l'expression du CD8, et perdent l'expression du CD4, devenant des lymphocytes T CD8+.

- Inversement, les lymphocytes T dont les récepteurs reconnaissent les complexes CMH de classe II conservent l'expression du CD4, et perdent l'expression du CD8, devenant des lymphocytes T CD4.

- Les lymphocytes T qui ne reconnaissent pas de molécule du CMH meurent par apoptose, c'est un échec de la sélection positive.

- Les lymphocytes T immatures double positifs dont les récepteurs reconnaissent fortement les complexes CMH dans le thymus meurent par apoptose. Ce phénomène, qui constitue la sélection négative, permet d'éliminer les lymphocytes T susceptibles de réagir de manière nocive contre les protéines du soi.

Les cellules T des patients lupiques répondent de façon anormale à la stimulation de leurs récepteurs de surface, et résiste à l'apoptose. Les LT CD8, par leur action cytotoxique, augmente la production de corps apoptotiques. Les LT CD4 exercent un rôle pathogène par le biais d'une activité auxiliaire sur les LT CD8 et LB par la sécrétion de différentes cytokines effectrices ou régulatrices.

Les cellules T CD8 peuvent agir comme des facteurs cytotoxiques capable de lyser des cellules cibles, et de générer de grandes quantités de nucléosomes et des fragments auto-antigénique. Elles sont reconnues par les auto-anticorps présents dans le sérum de patients, et considérés comme potentiellement impliqué dans la rupture de tolérance aux antigènes nucléaires (Couzi et al., 2007). Ainsi ces LT pourraient être directement responsable de certaines lésions rencontrées dans le lupus, notamment dans la néphrite lupique où on observe une localisation péri glomérulaire et corrèlent à la gravité de l'atteinte rénale.

Les lymphocytes T des patients lupiques sont anormalement activés et résistants à l'apoptose. Des altérations du récepteur T et de son activation par des voies de signalisation en aval, pourraient être à l'origine de ces anomalies.

Les LT infiltrent les tissus et participent à l'initiation et au maintien de l'inflammation. Le LT CD4, par leur action cytotoxique, augmente la production de corps apoptotiques. Ils exercent un rôle pathogène par le biais d'une activité auxiliaire sur les LT CD8 et sur les LB par la sécrétion de différentes cytokines effectrices ou régulatrices (Blanco et al., 2005).

## 2.2. Rôles des lymphocytes B dans le LES

### 2.2.1. Développement et maturation des cellules B normaux dans la moelle osseuse

Le développement des cellules B se fait au niveau de la moelle osseuse et à partir des cellules hématopoïétiques. Ces dernières génèrent des progéniteurs lymphocytaires communs (CLP), une partie migrera vers le thymus pour la formation des lymphocytes T et l'autre partie restera dans la moelle osseuse pour générer des cellules B appelé "cellule pro-B" (Elantak et al., 2012).

**Au stade pro-B**, auquel apparaissent les marqueurs CD19- CD22-, on observe aussi le réarrangement D-J de la chaîne lourde des immunoglobulines sur les 2 chromosomes.

**Au stade prés B**, se fait le réarrangement V-J de la chaîne légère et expression transitoire du marqueur CD10.

**Au stade B immature**, après le réarrangement de la chaîne lourde et légère d'immunoglobulines, la cellule B exprimera l'immunoglobuline de type IgM, la cellule est ainsi soumise à un 2ème stade de sélection qu'est possible par la présence des cellules stromales qui expriment à leurs surface des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi au niveau de la moelle osseuse (Luning Prak et al., 2011).

Nous sommes face à 3 possibilités :

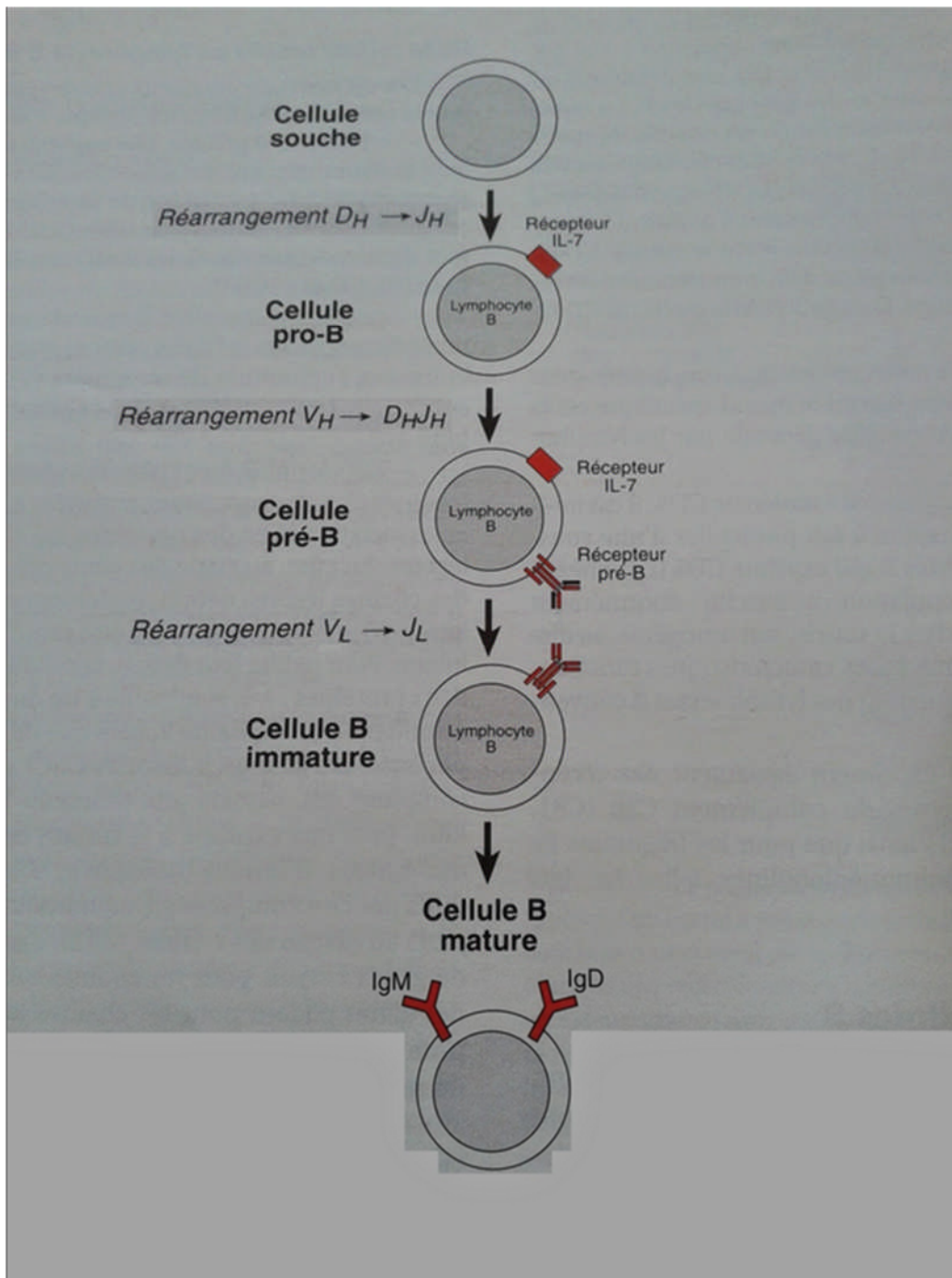
-Soit une forte affinité entre les cellules B et CMH qui sera considéré comme délétère pour le soi et sélectionné en recevant un signal de mort.

-Soit une affinité faible, qui sera considéré comme acceptable et ne recevra pas de signal de mort.

-Soit les cellules B n'interagiront pas avec les peptides, ainsi il y aura signal de mort.

A ce stade, il y aura une apparition des marqueurs CD20, CD23, CD40 (Elantak et al., 2012).

**Au stade B mature**, co-expression d'IgM et d'IgD qui se produit par épissage alternatif. Les cellules B naïve sont au stade ultime de développement dans la moelle osseuse. Elles acquièrent des antigènes de surface (Saito et al., 2003).



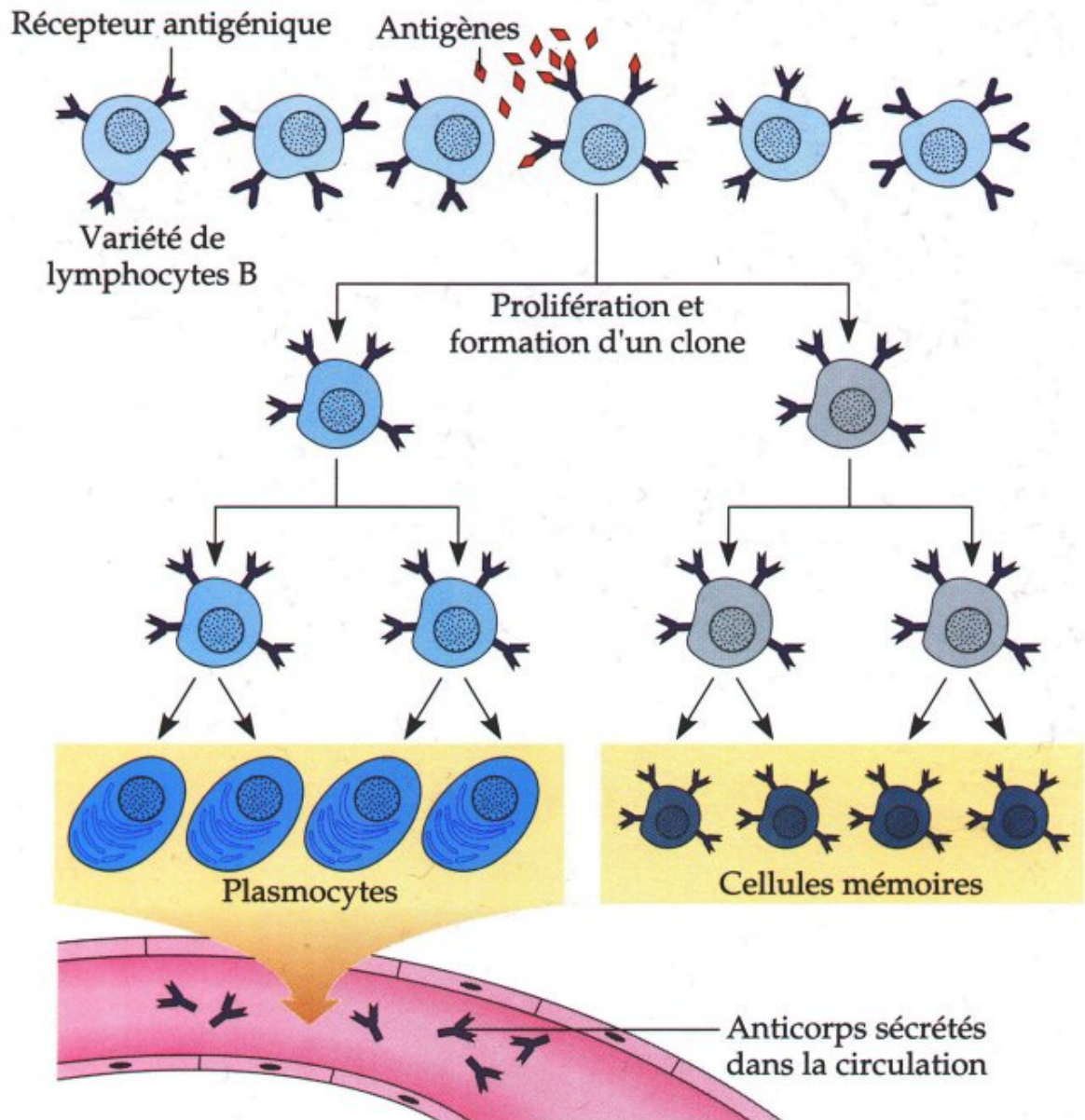
**Figure-6** : Stades de développement des lymphocytes B.

La figure 6 montre la différenciation et la maturation des cellules B; allant de la cellule souche au lymphocyte B mature et les réarrangements des gènes d'immunoglobulines.

Les lymphocytes B matures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires au niveau desquels elles rencontrent leur antigènes spécifique. On est face à 2 possibilités :

- Soit par la non rencontre avec l'Ag :  $\frac{1}{2}$  vie 3 jours

➤ Soit par la rencontre avec Ag qui induira la différenciation en plasmocyte ou LB mémoire (Lagresle-Peyrou et al., 2014).



**Figure-7** : Schéma représentatif de la maturation antigène dépendant des lymphocytes B.

Les lymphocytes B rencontrent les antigènes spécifiques, ils sont activés puis se multiplient par mitose (prolifération clonale) pour se différencier en plasmocytes sécrétrices d'anticorps dans la circulation et cellules mémoire à durée de vie longue pour réagir en cas d'une autre attaque par un même antigène.

### **2.2.2. Activation des LB normaux dans les organes lymphoïdes secondaires après rencontre avec les antigènes :**

Les lymphocytes B spécifiques reconnaissent un antigène unique et se multiplient rapidement dans les ganglions lymphatiques. Ils fabriquent des anticorps spécifiques dans le sang (molécules en forme de Y) capable de se fixer sur l'antigène spécifique et de le neutraliser.

La production d'anticorps dépend de l'activation des lymphocytes B, celle-ci se produit quand les anticorps membranaires d'un lymphocyte B, reconnaissent un antigène par leur partie variable. La stimulation d'un lymphocyte B a pour conséquence, sa multiplication et la différenciation en des cellules filles formant un clone de plasmocytes sécrétant des anticorps. Et des lymphocytes B mémoire, susceptibles de réagir rapidement en cas de nouveau contact avec le même antigène (Pieper et al., 2013).

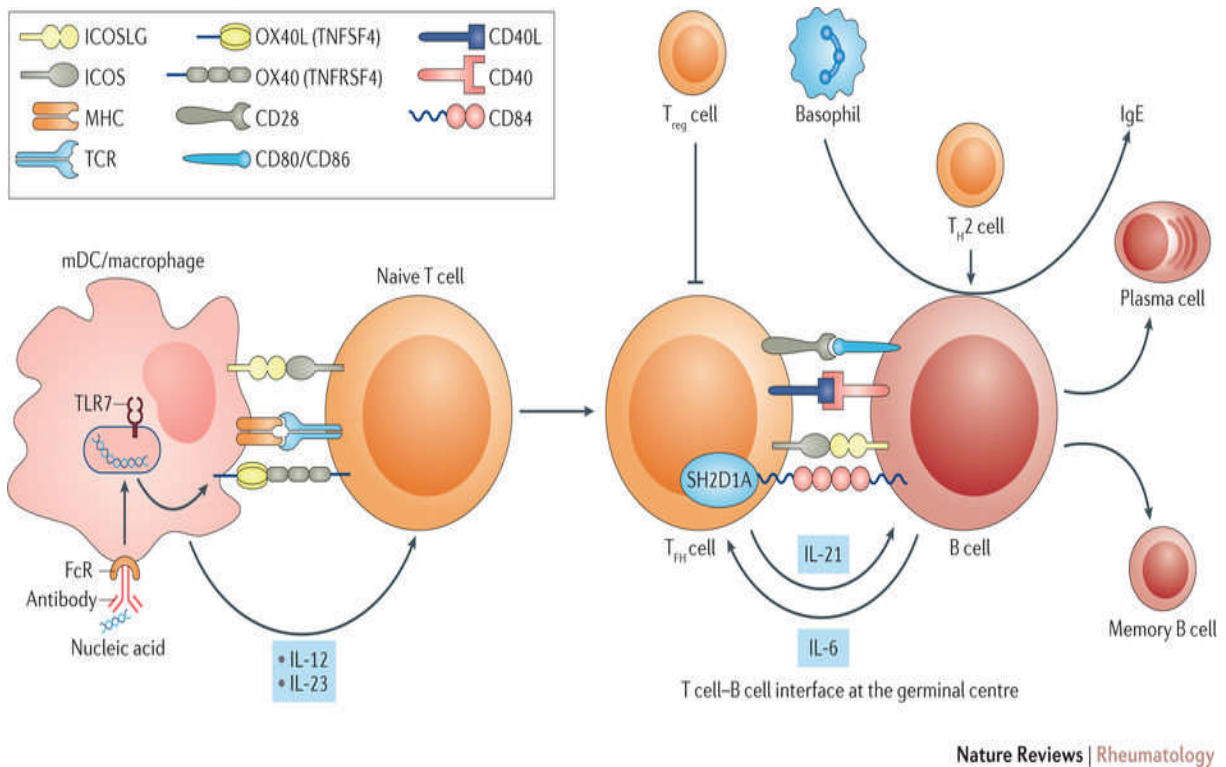
La spécificité des anticorps sécrétés par les plasmocytes, est identique à celle des récepteurs de lymphocyte B (BCR) stimulés au début de la réactivation immunitaire. On parle de sélection clonale car les lymphocytes B ne peuvent reconnaître qu'un seul antigène. Ainsi le clone de cellule B sélectionné se multiplie.

Les anticorps sont libérés dans le milieu extérieur et neutralisent les antigènes en formant des complexes immunes (Ac – Ag).

Dans la plupart des réactions immunitaires, la prolifération des lymphocytes B et la production des anticorps dépendent de messages chimiques, les interleukines, produites par les LT auxiliaires (LT CD4). L'activation de ces derniers, dépend le plus souvent de la présentation d'un antigène par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) comme la cellule dendritique.

Les LB sont les seules cellules capables de reconnaître un antigène circulant dans le milieu intérieur et assurent ainsi une surveillance permanente du milieu extracellulaire. L'élimination du complexe antigène-anticorps se fait par la phagocytose.

Le schéma sur la Figure-8 présente les étapes d'activation des Lymphocytes B :



**Figure-8** : Activation des cellules B dans lupus érythémateux systémique (Tsokos et al., 2016). Les cellules B sont considérablement influencées par le milieu de cytokines et le type de cellule T qui dérive de ce milieu de cytokines. Dans LES l'interaction de cellules B avec les cellules T folliculaire se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires. L'interaction tourne autour de l'enclenchement des récepteurs de surface des cellules sécrétrices de cytokines. FcR: récepteur du fragment Fc, Mdc: Cellule dendritique myéloïde, CMH: complexe majeur d'histocompatibilité, TCR: Récepteur des cellules T, Th2: Cellule T helper2, TLR: Toll-like récepteur, cellule Treg: cellule régulatrice T.

### 2.2.3. Perte de tolérance des cellules B dans le lupus

Il est indispensable de maintenir la tolérance des cellules B, pour anticiper la détection d'autoanticorps avec des caractéristiques pathogènes potentielles. Dans le cas du lupus, l'échec de la tolérance des cellules B, se situe au cœur du développement de cette maladie. En effet, il est certain que les lésions tissulaires résultent de la production des autoanticorps et des auto antigènes. Ils forment des complexes auto immuns, qui en se déposant sur les organes engendrent des inflammations et des lésions tissulaire (Nashi et al., 2010).

Les mécanismes de sélection des cellules B du sujets sains maintiennent une tolérance contre les antigènes liés au lupus suivant des fonctionnement communs. De plus certains mécanismes plus spécifiques sont impliqués pour prévenir la production de lupus associé d'auto-anticorps en raison de la nature fréquente des auto-antigènes du lupus. En effet, les

auto-antigènes associés au lupus se restreignent en grande partie aux complexes nucléoprotéiques qui sont libérés pendant la mort cellulaire et activent les TLR7 et TLR9 (Marshak-Rothstein et Rifkin, 2007).

Etant donnée que 55 à 75% des récepteurs des cellules B humaines exprimant un BCR immatures sont auto-réactives. Des mécanismes de tolérance sont nécessaires pour les éliminer du répertoire des cellules B. De plus des études ont identifiés plusieurs points de contrôle de tolérance auxquelles les cellules B auto-réactives sont régulées (Pillai et al., 2011). La tolérance centrale dans la moelle osseuse élimine les cellules immatures auto-réactives principalement par l'édition de récepteurs. L'échec de l'édition du récepteur engendre une anergie ou une suppression des cellules B auto-réactives déterminée par la fréquence des récepteurs. Les cellules B immatures qui passent par le point central de contrôle de la colonisation s'en vont vers la rate ou celles-ci développent des cellules B mature. A ce stade les cellules B auto-réactives sont régulées par les points de contrôle périphérique tels que : la suppression, l'anergie, l'exclusion folliculaire ou encore l'ignorance clonale. Entre autre, de récents travaux ont prouvés que les cellules B auto-réactives issues d'une réaction du GC sont tolérées si l'auto-antigène est exprimé en grande quantité et tout près du GC (Chan et al., 2012). Enfin l'élimination des cellules B auto-réactives ont été un enjeu thérapeutique majeur dans le lupus. Cela n'a pu être réalisé sans une compréhension totale de la façon dont les différents mécanismes de tolérances sont affectés dans le LES.

#### **2.2.4. Les anomalies des lymphocytes B chez les patients LES**

Le LES illustre le rôle central du lymphocyte B entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'axe interféron –BAFF, dont l'activation initiale pourrait être la conséquence d'une infection, contribue à l'activation des LB auto réactifs ayant échappés aux différents mécanismes de tolérance centrale et périphérique. Ces LB sont stimulées par leur récepteurs TOLL-Like (TLR7 et TLR9) et par leur BCR, chez les patients ayant certains facteurs de prédisposition génétique, des auto-anticorps qui se complexent aux débris apoptotique, dont la clairance est insuffisante.

Ces complexes immuns activent à leur tour les cellules productrices d'interféron, les cellules dendritiques plasmacytoïdes, ce qui entretient le cercle d'activation de l'axe interféron BAFF-LB.

La production d'auto-anticorps dépend de la capacité de cellules B auto-immunisées à devenir des cellules sécrétrices des auto-anticorps. Pendant ce processus, les cellules B perdent progressivement leur capacité prolifératrice mais augmentent le taux de production d'auto-anticorps.

Deux types de cellules sécrétrices ont été décrits dans la littérature : les Plasmablastes et les cellules Plasmatisques.

Les plasmablastes sont : CD19+ , CD20- , CD27+ , CD38++, CD138± , forte potentiel de prolifération des IL-6 dépendante des cellules qui ont la capacité de migration.

Les cellules plasmatisques sont : CD19+, CD20-, CD27+, CD38++ ,CD138+ qui ont perdus leur capacité de migration (Jourdan et al., 2009).

L'hyperactivité des LB associés aux auto-anticorps fait intervenir plusieurs voies de coopération cellulaire en particulier entre LB, LT et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ainsi il existe une hyperproduction d'IL-10 par les LB et les monocytes. Cette cytokine est impliquée dans la différenciation des LB en plasmocytes, la synthèse d'anticorps de classe IgG y compris d'auto-anticorps (LeBien et Tedder, 2008). L'IL-10 est également produite par les kératinocytes exposés aux UV et par le placenta au cours de grossesse (Le Thi Huong et al., 2008).

### **2.3. Les auto-anticorps dans le lupus**

Les patients souffrant d'un lupus, produisent des anticorps dirigés contre les molécules présentes dans le noyau des cellules. Parmi ces anticorps anti-nucléaire on retrouve les anticorps anti-ADN, très spécifiquement associés au lupus, mais d'autres auto-anticorps peuvent être retrouvés chez ces patients (Baline et al., 2015).

Le LES s'accompagne d'une hyperactivité lymphocytaire T et B conduisant à la production d'auto-anticorps dirigés contre de nombreux auto-antigènes qui peuvent être des molécules intracellulaires, membranaires ou des protéines plasmatisques.

Les anticorps antinucléaires sont positifs chez pratiquement tous les patients atteints de lupus (96%), mais ils sont peu spécifiques car ces anticorps sont retrouvés habituellement dans d'autres affections rhumatologiques, telles que le syndrome de Sjörgeu ou la polyarthrite rhumatoïde.

-**Anticorps anti ADN natif** : les anticorps anti-dsDNA dirigés contre l'ADN double brin natif sont spécifiques du L.E.S. car ils sont présents chez 70% des patients atteints de lupus. Le taux d'Ac anti- ADN peut aussi refléter l'activité de la maladie dans certains cas (Fu et al., 2015).

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

- **Anti-Smith (anti-Sm)** : Les anticorps anti-Sm ont pour cible des protéines faisant partie d'un sous-groupe de ribonucléoprotéines, les small nuclear ribonuclear protein (sRNP). Les anticorps anti Sm sont détectés chez 5 à 30% des patients avec un LES.

-**Anti-RNP** : Comme les anticorps anti-Sm, les anticorps anti-nucléo protéine (anti-RNP) sont dirigés contre des protéines faisant partie des snRNP, et plus précisément contre des 29 protéines associées à l'ARN. Ce sont donc des anticorps anti-U1RNP. Ces anticorps sont souvent détectés chez les patients LES.

- **Les anticorps anti-Ro/SSA** : sont dirigés contre des protéines faisant partie d'un complexe antigénique hétérogène. Ils sont présents chez 30 à 50 % des lupus spontanés, mais leur fréquence est plus élevée dans certains sous- types cliniques ou clinico biologiques, en particulier le lupus érythémateux cutané subaigu (Yoshimi et al., 2012).

**Les anticoagulants circulants et lesantiphospholipides** (anti- cardiolipine et anti-b2 glycoprotéine 1) : ont une activité pro-coagulante et sont associés à des complications thromboembolique et des avortements spontanés à répétition.

**Les anticorps anti –ribosomes P** : sont associés au L.E.S neuropsychiatriques, sont présents dans moins de la moitié des cas (Caponi et al., 2002, Carmona-Fernandes et al., 2013).

**Les anticorps anti-histidine** : sont associés entre autres aux LES induits par les médicaments.

## **2.4. Les complexes immuns du lupus (CI)**

La liaison des auto-anticorps aux antigènes cibles forme des complexes immuns circulants et tissulaires, ce dernier active la voie classique du complément et initie la réaction inflammatoire en recrutant par les macrophages, polynucléaires, neutrophiles, cellules dendritiques et lymphocytes (Toong et al., 2011).

La fixation d'Anticorps anti-ADN ou d'Anticorps anti-nucléosomes sur des nucléosomes ou de l'ADN glomérulaire ou, par réactivité croisée, sur d'autres antigènes (Ag) glomérulaires, forme des CI, initie l'inflammation glomérulaire et le recrutement de cellules inflammatoires. Les CI pourraient également se constituer dans la circulation et se déposer secondairement dans le glomérule en raison d'affinités ou de propriétés physicochimiques particulières. Il est aussi probable que d'autres auto-anticorps sans spécificité anti-ADN soient impliqués. Effectivement, des modèles murins ont montré que la glomérulonéphrite lupique pouvait se développer en absence d'auto-anticorps antinucléaires. L'activation du complément par les CI est probablement aussi impliquée dans les atteintes cutanées et neurologiques du LES (Mathian et al., 2014).

## **3. Traitements**

Il n'existe pas encore de traitement permettant une guérison définitive du lupus érythémateux Systémique (LES), cependant les traitements utilisés ont pour but de réduire l'inflammation, de préserver les fonctions vitales des malades lors des poussées graves, et de prévenir les poussées (Moura Filho et al., 2014).

Etant donné que les manifestations du LES sont très variables d'un malade à l'autre, la combinaison de médicaments doit être élaborée au cas par cas et évoluer en même temps que la maladie.

### **3.1. Traitements généraux**

- **Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS):**

Utiliser dans les formes légères et peuvent soulager les douleurs, mais ils sont rarement suffisants. De plus, en raison de leurs effets secondaires notamment au niveau rénal.

- **Corticoïdes (anti-inflammatoires stéroïdiens):**

C'est le traitement le plus courant pour traiter les formes aiguës.

Les corticoïdes sont prescrits, par voie orale ou en intraveineux (IV), à une dose élevée, progressivement diminuée jusqu'à une dose minimale, voire jusqu'à l'arrêt en cas de rémission.

Ce traitement fait l'objectif d'une surveillance médicale particulière, car la prise prolongée de corticoïde peut engendrer de nombreux effets secondaires tel que : l'hypertension artérielle (HTA), l'ostéoporose (déminéralisation des os), prise du poids, augmentation du risque d'infection, perturbation hormonales, troubles digestifs, musculaire, du sommeil...etc. La plus part de ses effets secondaires commencent à s'estomper quand les doses diminuent ou que le traitement est arrêté (Yildirim-Toruner et Diamond, 2011).

- **Les Immunosuppresseurs :**

Utiliser pour traiter les formes viscérales graves, notamment rénales et cérébrales, ils sont aussi employés lorsque les corticoïdes ne suffisent pas à contrôler le LES, ou que la cortisone entraîne trop d'effets secondaire (Moura Filho et al., 2014).

- **Cyclophosphamide et Azathioprine**

Sont des immunosuppresseurs les plus utilisés dans les formes sévères en association avec les corticoïdes.

- **Mycophénolate de mofétil (MMF)**

Nouvel immunosuppresseur utilisé de plus en plus dans les formes graves, Il entraîne une inhibition de la prolifération lymphocytaire B et T.

Les résultats thérapeutiques de ces traitements classiques sont souvent variables et généralement associés à des effets secondaires graves, donc des divers nouveaux produits biologiques qui visent spécialement les lymphocytes B ont été développés et évalués dans des tests précliniques et cliniques (Moura Filho et al., 2014).

### **3.2. Traitements biologiques (Biothérapie)**

Ces biothérapies sont essentiellement des anticorps monoclonaux (ACM) ou des protéines de fusion (molécules recombinante), dans leur rôle principale est : le blocage d'une cytokine pro-inflammatoire ; destruction ou neutralisation d'une population cellulaire ; blocage de fonctions cellulaires par inhibition des capacités de coopération (Terrier et Mouthon, 2013).

#### **3.2.1. Anticorps monoclonaux dirigés contre les LB**

##### **Anti-CD20 : Rituximab**

Le CD 20 est une protéine membranaire largement exprimé à travers les différent stades du développement des cellules B, Sauf dans les lymphocytes B activés et différenciés en plasmocytes. Cet antigène joue un rôle central dans les réponses aux anticorps indépendantes des lymphocytes T.

Le Rituximab est le premier ACM approuvé par la food and drug administration (FDA/USA) pour le traitement des Lymphomes B. Son efficacité au cours de la polyarthrite rhumatoïde à ouvert la voix à son utilisation dans d'autres maladie auto-immunes parmi lesquelles le LES.

Ce médicament induit la mort des cellules B à travers un certain nombre de mécanismes, y compris l'induction directe de la mort cellulaire programmée (apoptose), ainsi que la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et du complément (Terrier et Mouthon, 2013).

##### **Anti CD22 : Epratuzumab**

Le CD22, est la deuxième cible d'anticorps pour la thérapie des LES après CD20. C'est une glycoprotéine transmembranaire spécifique aux lymphocytes B, exprimée sur la surface des cellules B mature IgM+IgD+, ainsi dans le cytoplasme des cellules pré-B, mais absente sur les lymphocytes B différenciés en plasmocytes et des lymphocytes B mémoire. Le CD22 Joue un rôle important dans la régulation de la fonction des cellules B, comme récepteur aux lectines, et comme composant du complexe d'activation des LB.

L'epratuzumab est un ACM humanisé dirigé contre le récepteur CD22, en cours d'évaluation dans le traitement des patients atteints de LES à activité modérée ou sévère.

L'analyse biologique faite sur les patients traités avec epratuzumab a montré une diminution importante des lymphocytes B CD27- et de l'expression membranaire du CD22,

suggérant une action préférentielle de l'epratuzumab sur des lymphocytes B transitionnels et naïfs. Des études fonctionnelles ont également montré un effet immunomodulateur de l'epratuzumab *in-vitro*, celui-ci diminuait l'activation et la prolifération exagérée des lymphocytes B de patients lupiques stimulés par une anti-immunoglobuline de surface et CD40L ou CpG, mais était sans effet sur la prolifération de lymphocytes B normaux (Terrier et Mouthon, 2013).

### **Inhibiteurs de la cytokine BAFF ou BLyS (anti-BAFF) : le belimumab**

BLyS est une cytokine membre de la superfamille du TNF qui a un rôle important dans la sélection des lymphocytes B immatures ainsi que dans la survie, l'activation et la prolifération des lymphocytes B matures et la production des plasmoblastes et des plasmocytes (Stoeger et al., 2014).

Le belimumab est un ACM humain de type IgG1 lambda, capable de se fixer à la cytokine BAFF. Ce médicament induit la diminution des lymphocytes B circulantes, ainsi que leur différenciation en cellules productrices d'anticorps (Bassis, 2012).

### **3.2.2. Traitements ciblant les autres cellules du système immunitaire**

#### **Anti -IL-21**

La production de l'IL-21 (interleukine-21) est restreinte aux lymphocytes T CD4 et aux lymphocytes NK. Par contre, l'expression de son récepteur est beaucoup plus large et concerne essentiellement les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules NK, les cellules dendritiques, les macrophages.

L'IL-21 favorise la maturation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes, ainsi que la maturation des lymphocytes T CD8+ et probablement celle des cellules NK. Elle a par contre un effet inhibiteur sur les fonctions des cellules dendritiques. L'IL-21 favorise le développement des populations T CD4+ en Th17. Ces effets expliquent qu'elle puisse avoir un effet anti-tumoral mais surtout un effet délétère dans les pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires. Son utilisation comme cytokine anti-tumorale a été envisagée, mais il semble actuellement que l'utilisation d'anticorps anti IL-21 dans les pathologies auto-immunes devrait être au final une stratégie plus rentable (Costanzo et al., 2010).

# Partie pratique

# Chapitre-3: Matériels et Méthodes

## Collecte des échantillons

La partie expérimentale de cette étude s'est déroulée en deux parties ; la première partie consiste la quantification des cellules NK, LB et LT a été réalisée sur 8 patients lupique et 8 contrôle (50% d'homme et 50% de Femme ) avec la technique d'immuno-marquage suivi d'une analyse par la technique de cytométrie en flux au sein du laboratoire d'hémobiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou, la deuxième partie consiste la détection et l'identification des différents auto-anticorps anti-nucléaires responsables des nombreuses complications associées à la maladie du LES. Cette analyse nous l'avons réalisée sur 25 patients atteints de cette maladie au niveau du laboratoire d'immunologie de l'établissement public hospitalier (EPH) de Rouiba.

## Méthodes

### 1. Cytométrie en flux

#### 1.1. Prélèvement du sang

Le prélèvement est réalisé par une prise du sang au niveau du pli de coude (sang périphérique), Le sang prélevé est conservé dans un tube contenant de l'EDTA (une substance anti-coagulante).

Un test FNS (numération formule sanguine) permet la numération des globules blancs (lymphocytes) par volume du sang, est obligatoire avant de passer à la CMF.

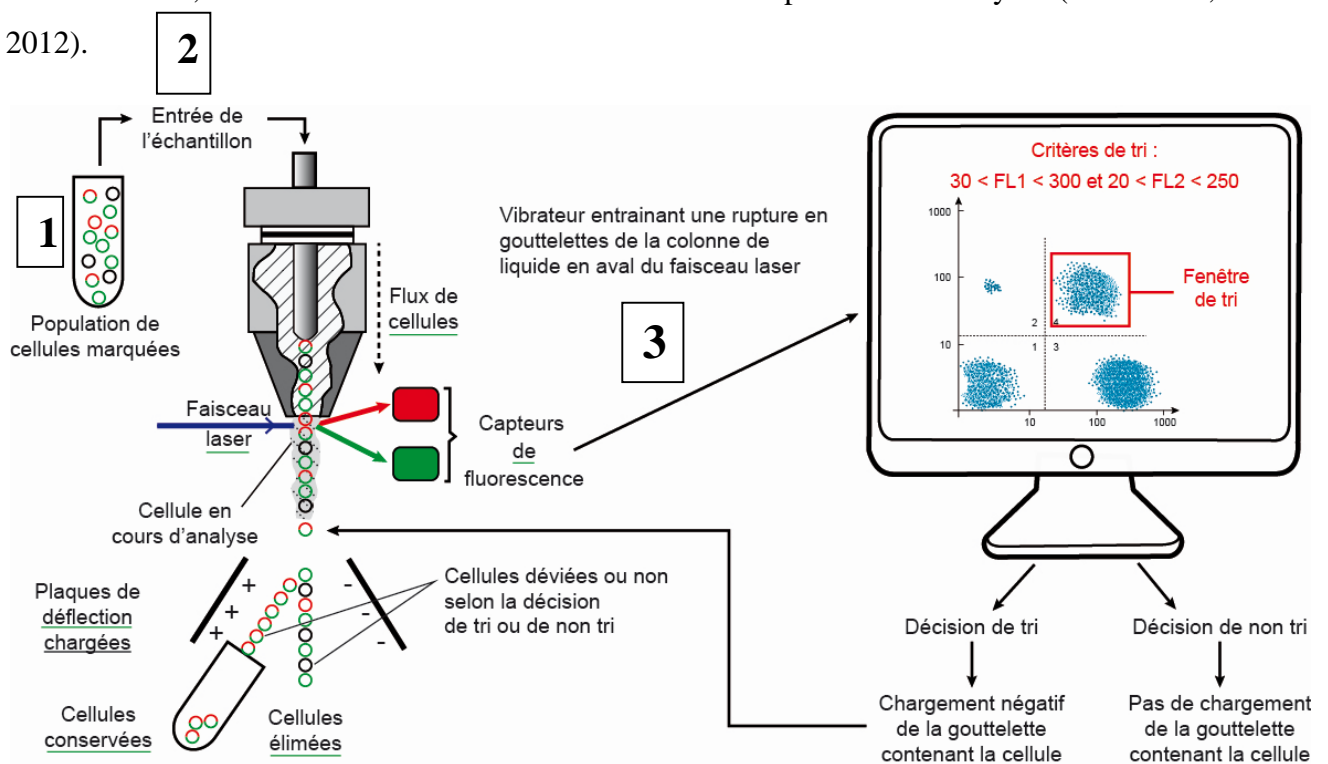
#### 1.2. Principe

La cytométrie en flux (CMF) est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle tel que la taille, la granularité ou la complexité interne et l'intensité relative de fluorescence, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

La CMF est associée à l'immuno-marquage afin d'étudier les systèmes biologiques. En effet l'utilisation des anticorps monoclonaux (AcM), dirigés contre des composants membranaires spécifiques, permet de distinguer entre les sous-populations lymphocytaires. Ces dernières

années, l'identification et la caractérisation des antigènes de surface des lymphocytes ont progressés. Cependant, il n'existe pas des anticorps reconnaissent une cellule particulière pourvue de quelque fonctions. Pour cette raison l'immunofluorescence a passée des simples aux multiples marquages en utilisant des combinaisons d'un anticorps révélés par des fluorochromes différents.

Le but de cette méthode en immunologie est la détection ou l'identification des sous-types des cellules impliquées dans l'immunité et aussi pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de différentes affections. L'échantillon cellulaire doit être en suspension pour pouvoir être analysées. le sang est en suspension, donc son analyse est facile par contre si l'échantillon sont des tissus, les cellulaires doivent être dissociés afin de pouvoir les analysés (Picot et al., 2012).



**Figure-9** : Schéma illustrant le principe de fonctionnement de la cytométrie en flux.

### 1.3. Immunophénotypage des lymphocytes par cytométrie en flux

#### ➤ Lavage

Deux lavages sont effectués pour éliminer les impuretés

Un volume de 4ml de PBS (phosphate buffer saline pH 7.2) est ajouté à un volume de 1ml de l'échantillon (sang prélevé contenant de l'EDTA).

Le tube est agité doucement par retournement, puis centrifuger à 1500 tours/minute durant 5 minutes. Cette étape est renouvelée après élimination du surnageant par aspiration.

#### ➤ **La dilution**

Le culot obtenu est additionné à 1ml de PBS ou plus en fonction de la numération des globules blancs (GB) et de la dilution à effectuer (pour un taux de GB à 20000 éléments/mm<sup>3</sup>).

#### ➤ **Marquage**

Le marquage des cellules est effectué à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes voir le tableau VII :

**Tableau VII** : panel d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochrome (Beckman Coulter).

Fluochrome	FITC (20UI)	PE (10UI)	PC5 (10UI)
Anticorps	CD3	CD19	CD56

Un volume de 100 µl de sang dilué est ajouté dans les tubes contenant les anticorps, ensuite sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Afin d'éliminer l'excès d'anticorps non fixé un lavage des cellules est effectué avec 4 ml de la solution tampon PBS, puis centrifuger à 1500 tours/minute, durant 5 minutes. Le surnageant est ensuite éliminé par retournement des tubes.

#### ➤ **Lyse des hématies (globules rouges) et analyse au cytomètre**

Afin d'éliminer les globules rouge, 2ml de solution de lyse est ajouté dans chacun des tubes précédent. Les tubes sont vortexés immédiatement, puis incubés pendant 15 minutes à une température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette étape est renouvelé après élimination du surnageant par retournement des tubes. A la fin, les échantillons sont analysés au cytomètre Facs Accuri C6 flow cytometer (BD Bioscience). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel Flow-Jo (<https://www.flowjo.com>).

## **2. Recherche des auto-anticorps**

La recherche des auto-anticorps est un examen très régulièrement utilisé dans les situations cliniques peu claires. Leur détection repose sur une démarche en deux méthodes qui sont

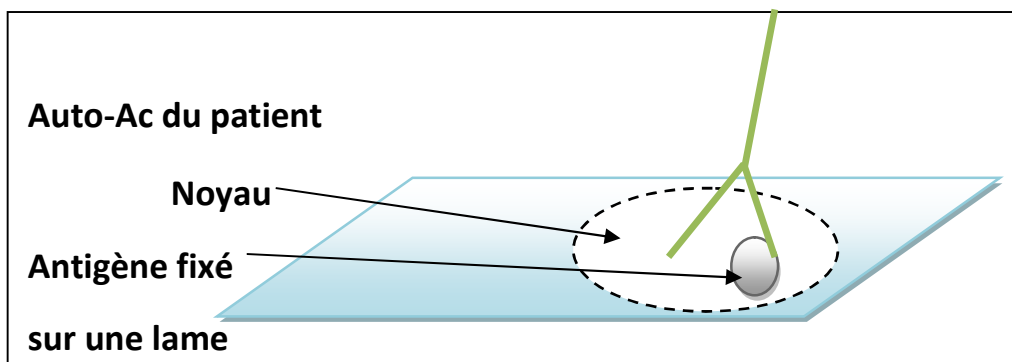
habituellement utilisées pour rechercher des ANA. Il faut commencer par un dépistage à l'aide d'une immunofluorescence indirecte, si le dépistage est positif, il se poursuit par une étape d'identification grâce à la méthode ELISA anti-dsDNA (IgG) afin de détecter les anticorps anti-ADN double brin, ainsi que la méthode ELISA profil anti-ENA (IgG) pour la détection des anticorps (IgG) antinucléaires solubles dans le sérum des patients (Sm/RNP, Sm, SS-A, SS-B, Scl-70 et Jo-1).

## 2.1. Immunofluorescence indirecte (IFI) :

### 2.1.1 Principe :

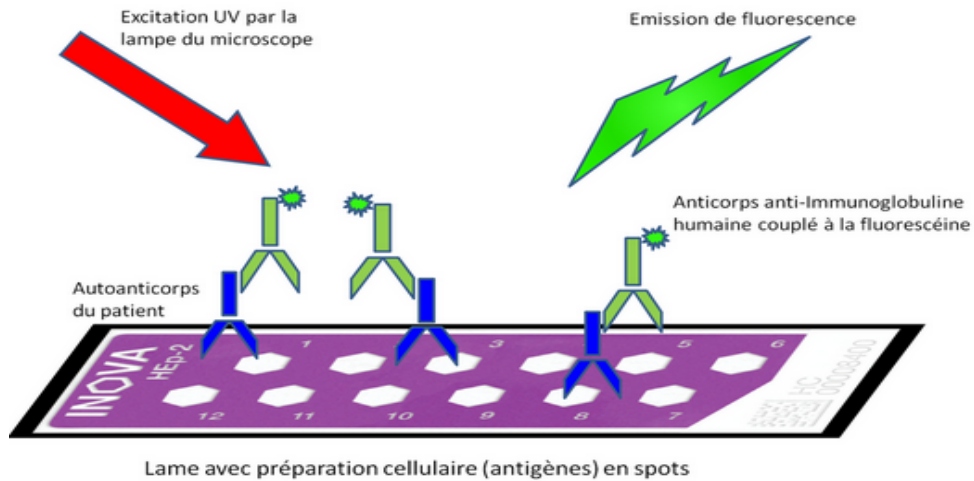
L'IFI est une technique d'immuno-marquage, utilise les propriétés de la réaction antigène /anticorps, elle permet la détermination qualitative de la présence des auto-anticorps reconnaissant différents antigènes anti nucléaire dans le sérum. Elle est effectuée sur des frottis de cellules Hep-2 qui sont des lignées de cellules dérivés du cancer du laryngé humain utilisées par la plupart des kits commerciaux (EURO-IMMUN Instructions for the indirect immunofluorescence test).

Cette technique s'effectue en deux étapes : lors d'une première incubation les anticorps anti-nucléaire du sérum (FAN, anti ADN, anti-nucléosome, anti-histone, anti-ARN) se lient aux antigènes correspondants exprimés sur les cellules Hep-2 (les cellules sont déposées dans des puits d'une microplaque), il y aura formation du complexe antigène/anticorps (Figure-10).



**Figure-10** : Fixation de l'auto-anticorps à l'antigène.

La deuxième incubation est réalisée avec un anticorps anti-immunoglobuline humaine marqué par des fluorochromes (anticorps secondaire) (Figure 11). Ce sont des substances qui ont pour propriétés d'émettre une fluorescence dans le visible lorsqu'ils sont excités par une lumière dans les longueurs d'onde de l'ultra-violet. La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. (Chan et al., 2015, Tozzoli et al., 2012).



**Figure-11** : Les étapes de l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur une lame de cellule Hep-2.

### 2.1.2. Mode opératoire :

#### ➤ Préparation du sérum

Centrifugation des tubes contenant le sang des patients à 1500 tours /min pendant 5 min. Récupérer le surnageant (sérum).

#### ➤ Dilution

Le sérum obtenu est dilué au 1/80 dans le tampon PBS (10 µl + 790 µl de PBS).

Les tubes sont vortexés immédiatement à l'aide d'un vortex.

#### ➤ Incubation des échantillons :

30µl de chaque échantillon dilué est déposé dans les puits respectifs de la microplaque contenant des Antigènes déjà fixés, on commençant toujours de mettre le contrôle positif et négatif dans les deux premiers puits des lames (Figure-12).



**Figure-12** : Dépôt des échantillons et du contrôle sur la microplaque.

Laisser incuber 30 min dans une chambre humide, et à une température ambiante (18C°- 25C°).

➤ **1<sup>er</sup> lavage :**

Rincer la microplaque avec la solution de lavage (PBS) afin d'éliminer l'excès de solution ensuite directement immerger dans une cuvette qui contient du PBS pendant 5 minutes.

Laisser la plaque sécher a l'air libre.

➤ **Addition de l'Anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome**

25 µl d'AC conjugué (anticorps de chèvre anti-Ig humaines marqué à FITC) est pipeter dans chaque puits.

Incuber 30 min à température ambiante (18C°- 25C°) et à l'abri de la lumière.

➤ **2<sup>ème</sup> lavage :** (similaire au 1<sup>er</sup> lavage)

Rincer la microplaque avec solution de lavage (PBS) afin d'éliminer l'excès du conjugué, puis immerger dans une cuvette contenant du PBS pendant 5 minutes.

Transfert de la plaque dans une autre cuvette contenant du bleu d'EVANS (mélange de PBS avec quelque goutte de bleu d'EVANS) pendant 5 minutes.

Sécher la plaque a l'aide d'un papier absorbant.

➤ **Addition du glycérol**

10 µl de glycérol est déposé sur chaque puits de la lame et recouvrir avec un couvre-lame tout en évitant la formation de bulles d'air.

## ➤ Lecture

Les lames sont observées au microscope à fluorescence avec les grossissements x20 et x40.



**Figure 13** : Analyse des lames par microscope à fluorescence.

## 2.2. ELISA anti-dsDNA (IgG)

### 2.2.1. Principe

En fonction de l'aspect de la fluorescence observée, différentes techniques pourront être utilisées pour l'identification des AAN. on utilise généralement le Test ELISA :

Les fragments d'ADN natifs sont fixés au fond des puits des plaques de microtitration fixant les auto-anticorps du sérum du patient, qui seront ensuite révélés par un anticorps anti\_Ig\_G humaine marquée. Les résultats sont quantitatifs et exprimés (UI/ml). Le kit d'essai Elisa (EUROIMMUN Anti-dsDNA ELISA IgG) fournit une analyse quantitative *in vitro* pour les auto-anticorps humains de la classe IgG contre l'ADN double brin (dsDNA) dans le sérum. Dans la première étape de réaction, des échantillons des patients dilués sont incubés dans les puits de la microplaque. Dans le cas d'échantillons positifs les anticorps IgG spécifiques (aussi IgA et IgM) lieront aux antigènes. Pour détecter les anticorps attachés une deuxième incubation est effectuée utilisant un anticorps secondaire anti-humain étiqueté d'enzyme IgG (conjugué d'enzyme) catalysant une coloration d'un chromogène.

## 2.2.2. Mode opératoire

### ➤ Dilution

5µl de sérum sont dilués dans 1000 µL de tampon échantillon provenant du kit Elisa (SAMPLE BUFFER), puis vortexer.

Vortex des trois calibrateurs (standards) ainsi que les contrôles positif (+) et négatif (-).

### ➤ Incubation du sérum

100µl de chaque calibrateurs (IgG humain) avec différente concentration (cal1 : 800UI/ml, cal2 : 100UI/ml, cal3 : 10UI/ml) et contrôle + et - et puis le sérum dilué sont déposé dans chaque puits.

Incubation pendant 30 min à température ambiante (18C°-25C°).

### ➤ 1<sup>er</sup>Lavage

Rincer les puits 3 fois successivement avec la solution de lavage du kit Elisa (10µl de solution WASH BUFFER diluée avec 90µl d'eau distillée) afin d'éliminer l'excès de la solution.

Séchage avec du papier absorbant.

### ➤ Incubation de l'anticorps secondaire conjugué à HRP

100µl d'Ac secondaire sont pipetés dans chaque puits, ensuite laisser Incuber pendant 30 min à une température ambiante (18C°-25C°) et à l'abri de la lumière.

### ➤ 2<sup>eme</sup>Lavage

Rinçage de la plaque 3 fois successivement pour éliminer l'excès d'Ac secondaire non fixés.

### ➤ Incubation du substrat

100 µl de la solution substrat (chromogène (TMB)) sont pipeter dans les puits.

Laisser incuber pendant 15min à température ambiante (18C°-25C°) sous agitation et à l'abri de la lumière.

➤ **Arrêt de la réaction**

100 µl de solution stop (0.5 M acide sulfurique) sont pipeter dans les puits afin d'arrêter la réaction enzymatique.

➤ **La mesure de l'absorbance à 450 nm sur un lecteur de plaque**

Lecture de la luminescence à 450 nm de la plaque de micro-titration sur un lecteur de plaque Elisa et analyse des résultats.



**Figure-14** : lecteur de plaque Elisa

## **2.3. ELISA profil anti-ENA (IgG)**

### **2.3.1. Principes**

Le kit d'essai d'Elisa (EURO-IMMUN Anti-ENA ProfilePlus1 ELISA IgG) fournit une analyse **semi-quantitative** *in vitro* pour les auto-anticorps humains de classe IgG dans le sérum. Six antigènes différents sont détecter:, nRNP/Sm , Sm, SS-A , SS-B, Scl-70, Jo-1. Dans la première étape de la réaction, des échantillons des patients dilués sont incubés dans les puits d'une microplaque. Dans le cas d'échantillons positifs les anticorps IgG spécifiques (aussi IgA et IgM) lieront aux antigènes. Pour détecter les anticorps attachés, une deuxième incubation est effectuée utilisant un Ac secondaire anti-humain couplé à une enzyme (conjugué d'enzyme HRP), qui est capable de promouvoir une réaction colorée.

### **2.3.2 Mode opératoire:**

➤ **Dilution**

Dilution de 10 µl de sérum dans 2000 µl solution tampon provenant du kit Elisa SAMPLE BUUFFER et vortex.

Vortexer le calibrateur (standard et le contrôle négatif –).

➤ **Incubation du sérum**

100 µl de calibrateur et contrôle négatif (–) et du sérum dilué sont déposés dans chaque puit.

Incuber pendant 30 min à température ambiante (18°C-25°C).

➤ **1<sup>er</sup> Lavage**

Rinçage des puits 3 fois successivement avec la solution de lavage du kit (10 µl de solution WASH BUFFER diluée avec 90 µl de l'eau distillée) afin d'éliminer l'excès de la solution.

Séchage avec du papier mouchoir.

➤ **Incubation de l'anticorps secondaire conjugué à l'enzyme HRP**

100 µl de l'Ac secondaire sont pipetés dans chaque puits. Incuber pendant 30 min à température ambiante (18°C-25°C) à l'abri de la lumière.

➤ **2<sup>ème</sup> Lavage**

Rinçage de la plaque 3 fois successivement pour éliminer l'excès d'AC secondaire non fixés.

➤ **Incubation du substrat**

100 µl de la solution substrat (chromogène (TMB)) sont pipetés dans chaque puits.

Incubation pendant 15 min à température ambiante (18°C-25°C) sous agitation et à l'abri de la lumière.

➤ **Arrêt de la réaction**

100 µl de solution stop (0.5 M acide sulfurique) sont pipetés dans les puits afin d'arrêter la réaction enzymatique.

➤ **Mesure de l'absorbance à 450 nm sur un lecteur de plaque**

Lecture de la luminescence à 450 nm de la plaque de micro-titration sur un lecteur de plaque Elisa et analyse des résultats.

## **Analyse statistique**

Afin de vérifier la signification statistique de nos résultats nous avons procédé au test d'analyse de la variance (ANOVA factorielle) sous le logiciel Statistica version 7.1. Le seuil de significativité du test été fixé à 5%.

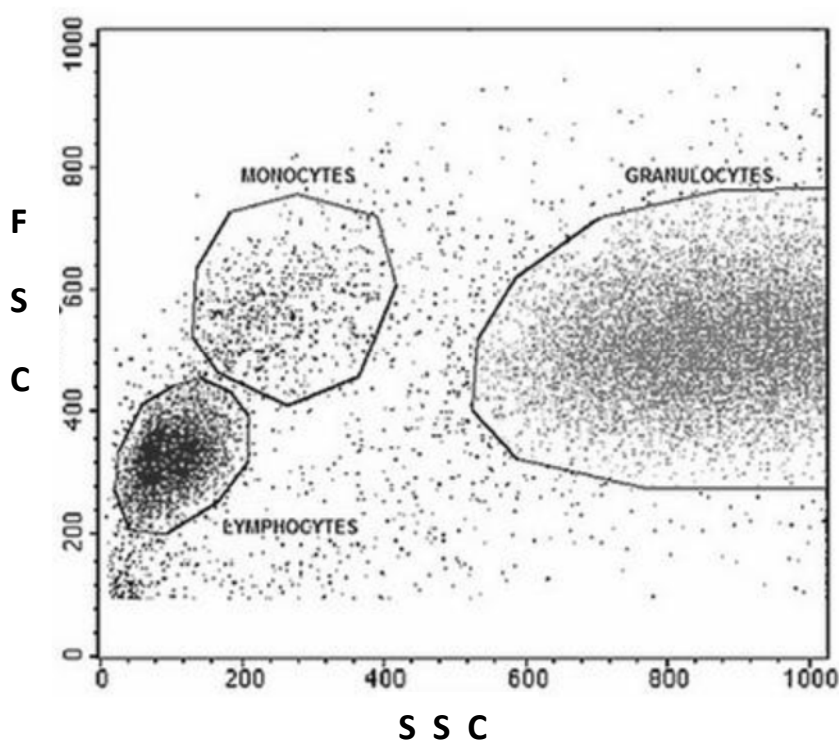
# Resultats et Discussion

# Résultats et Discussion

## 1. Quantification des populations de cellules NK, LB et LT par la technique de cytométrie en flux chez des patients LES

### 1.1. Stratégie de marquage et analyse des populations lymphocytaires et de cellules NK du sang périphérique issus de patients lupique

#### 1.1.1. Analyse morphologique des cellules sanguine:



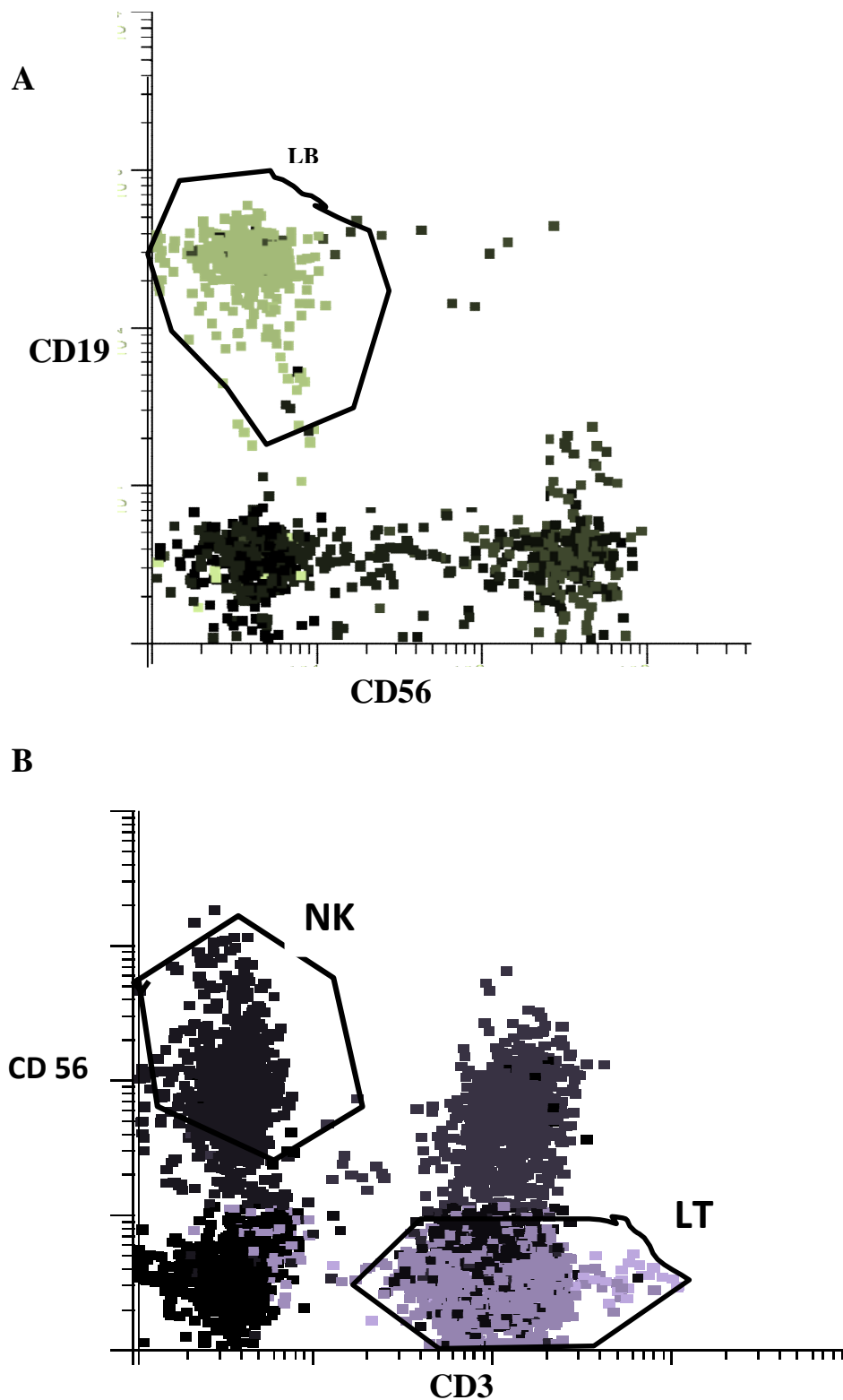
**Figure-15** : Histogramme de représentation en nuage (Dot Plot) de cellules analysées par cytométrie en flux.

L'analyse bi-paramétrique FSC: Forward Light Scatter (taille relative des cellules) et du SSC: SideScatter (granularité relative) des cellules sanguines présente une allure sous forme de nuage de points regroupés. Chaque point correspond à une cellule désigné également événement. A partir de ces nuages de point il est donc possible de visualiser et analyser les différentes populations cellulaires selon les 2 critères taille, et granulosité cellulaire.

L'analyse des échantillons au cytomètre montre que les lymphocytes correspondent à une population de cellules homogène relativement de petites tailles possédant un cytoplasme non

granuleux et un noyau régulier. Les lymphocytes présentent des valeurs FCS et SSC relativement inférieures comparés à celles des polynucléaires et monocytes. D'autre part, les granulocytes sont des cellules plus larges contenant un noyau volumineux et segmenté et ayant un cytoplasme très granuleux de ceux fait elles présentent des paramètres FSC et SSC très élevés. Les monocytes quant à eux montrent des paramètres taille et granulosité de valeurs intermédiaires.

1.1.2. Stratégies d'immuno-marquage des lymphocytes T et B et cellules NK avec les anticorps spécifique: anti CD3, anti CD19 et anti CD56



**Figure-16 :** Diagramme représentant l'immuno-marquage des lymphocytes et cellules NK. Avec : (A): anti CD19-PE et un anti CD3-FITC, (B): anti CD56-PC5 et anti CD3-FITC.

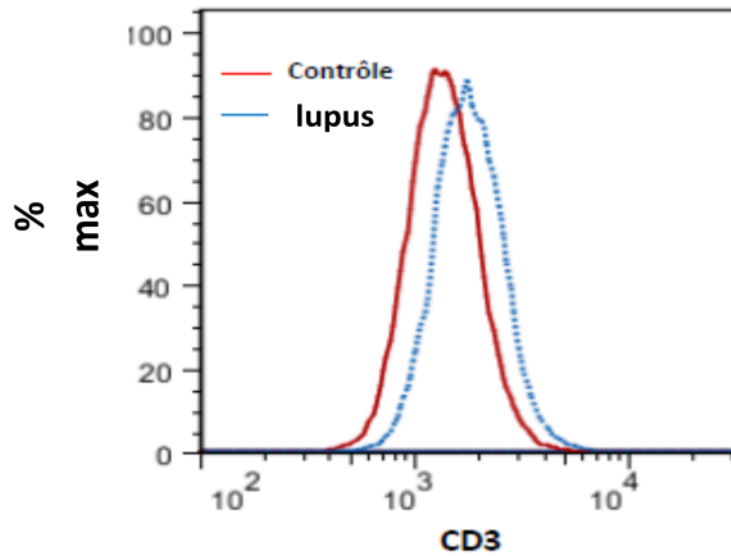
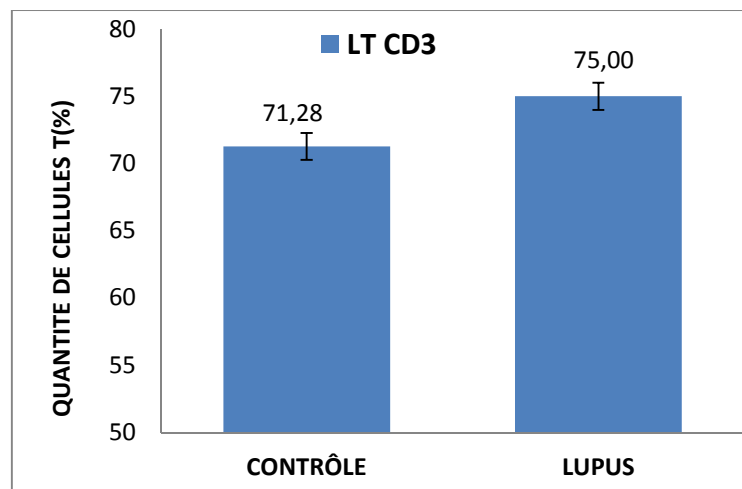
Pour l'analyse et l'évaluation des différentes populations cellulaires (Lymphocytes B, Lymphocytes T et cellules NK) nous avons procédé à un immuno-marquage spécifique des récepteurs de la population donnée avec des anticorps monoclonaux correspondant marquées avec les fluorochromes appropriés (anti CD19-PE, anti CD56-PC5, anti CD3-FITC). Sur les diagrammes A et B de la Figure 16 sont représenté les stratégies d'analyse des populations lymphocytaire T et B ainsi que des cellules NK suivant le triple marquage avec les anticorps appropriés.

Les diagrammes sur la Figure-16 représentent la stratégie d'analyse des populations lymphocytaires T et B ainsi que les cellules NK suivant le triple marquage avec les anticorps appropriés.

## **1.2. Quantification des cellules NK, LB et LT dans le sang périphérique des patients lupique versus individus sain**

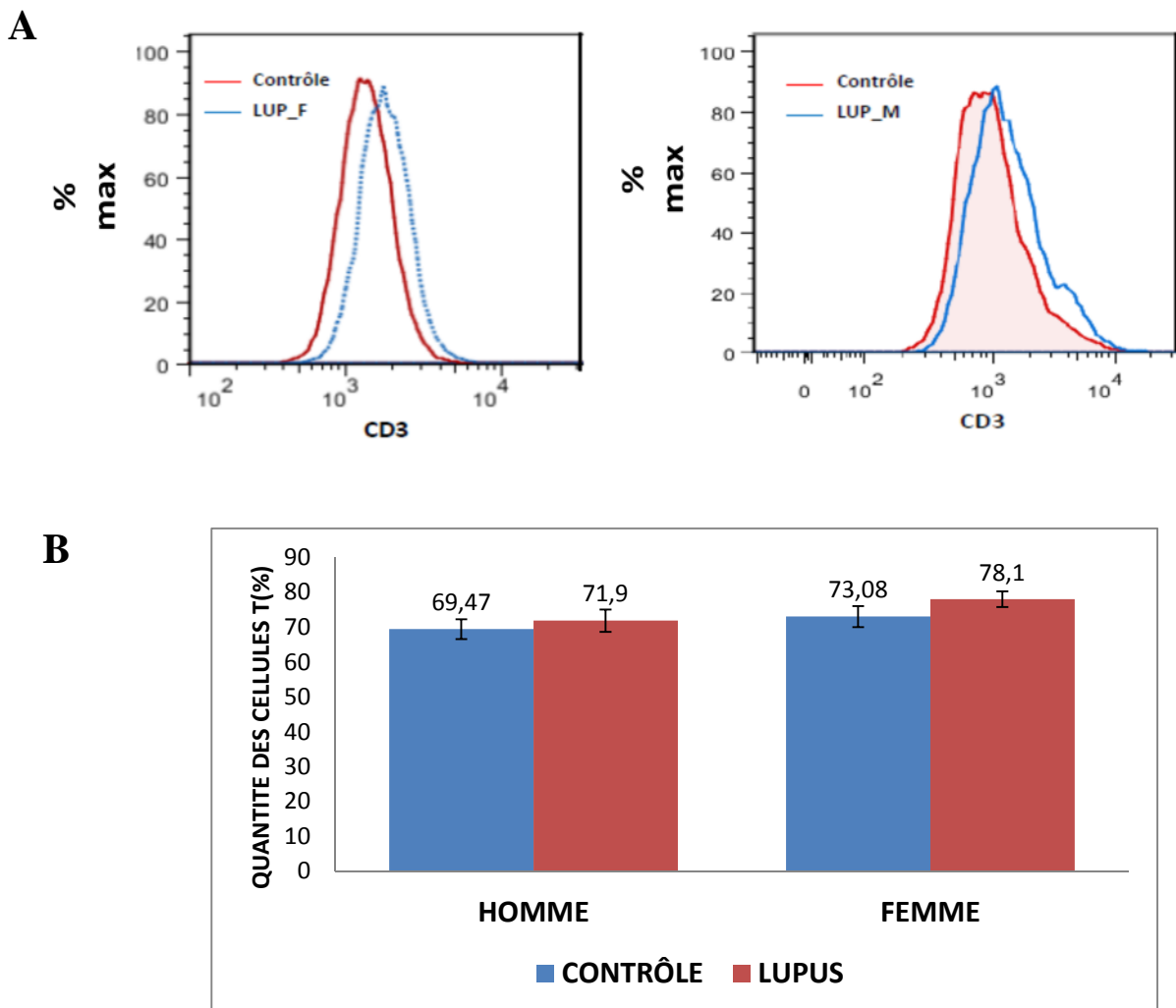
### **1.2.1. Quantification des cellules T (CD3+) chez les patients lupique**

La Figure 17 représente les résultats de l'immuno-marquage associé à la quantification de la population LT Total (CD3+) obtenu chez les patients lupique versus contrôles. Les résultats montrent une nette augmentation estimée à environ 4% du nombre de LT CD3+ présent dans le sang des patients atteints de lupus par rapport aux individus sains. Cette augmentation est synonyme d'une hyper-activation des Lymphocytes T chez les patients qui se répercutent par la contribution accrue des LT à l'activation du système immunitaire et au développement de réponses immunes contre les molécules du soi. Le test statistique ANOVA a donné une p-value  $< 0.001$ , de ce faite les variations dans la présence des LT observées entre les contrôles et patients sont statistiquement très significative.

**A****B**

**Figure-17** : Immuno-marquage des Lymphocytes T CD3 chez les patients versus contrôles.avec: A- Résultat représentatif de l'immuno-marquage des LT chez les patients lupique versus contrôles. B-moyenne et écart-type des pourcentages de présence des cellules T chez les patients ainsi que les contrôles.

### 1.2.2 Variation de la quantité des lymphocytes T CD3 dans le sang des patients lupiques en fonction du sexe :

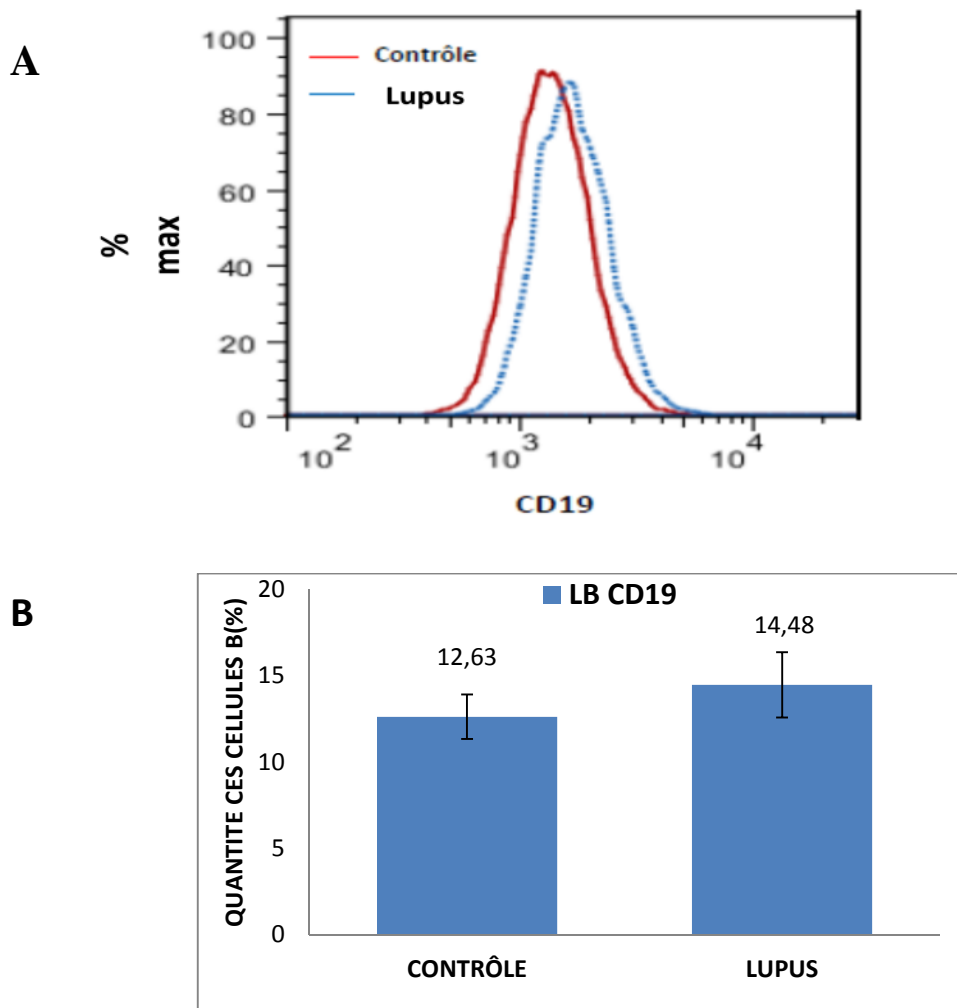


**Figure-18** : Immuno-marquage des Lymphocytes T CD3 chez les patients lupique versus contrôles en fonction du sexe. Avec : A- Résultat représentatif de l'immuno-marquage des LT chez les patients lupique versus contrôles en fonction du sexe. B- moyenne et écart-type des pourcentages de présence des cellules T chez les patients lupique ainsi que les contrôles en fonction du sexe.

Les résultats montrés sur la Figure-18 illustrent que la population lymphocytaire T totale (CD3+) est très élevée chez les femmes lupiques estimée à 78.1% en les comparant avec le nombre des LT CD3+ dans le sang des individus sains de sexe féminin, ces derniers présentent une valeur moyenne de 73.08 %. Également on observe une augmentation à un degré moindre chez les patients masculins qui atteignent la valeur de 71,90 % du total des lymphocytes du sang périphérique. Alors les contrôles sont à 69.5 %. L'histogramme de la figure 18 montre une présence très élevée de cellules T (CD3+) chez les males lupiques par rapport aux contrôles.

De ce fait on peut conclure que la population lymphocytaire T CD3 chez les patientes lupique affiche un taux de LT totaux nettement supérieure aux nombre de LT CD3+ ce qui peut être à l'origine d'une hyper-activation caractérisant les patientes lupiques qui peut être à l'origine de l'apparition de complications pathologiques.

### 1.2.3. Quantification des cellules B (CD19+) chez les patients lupique



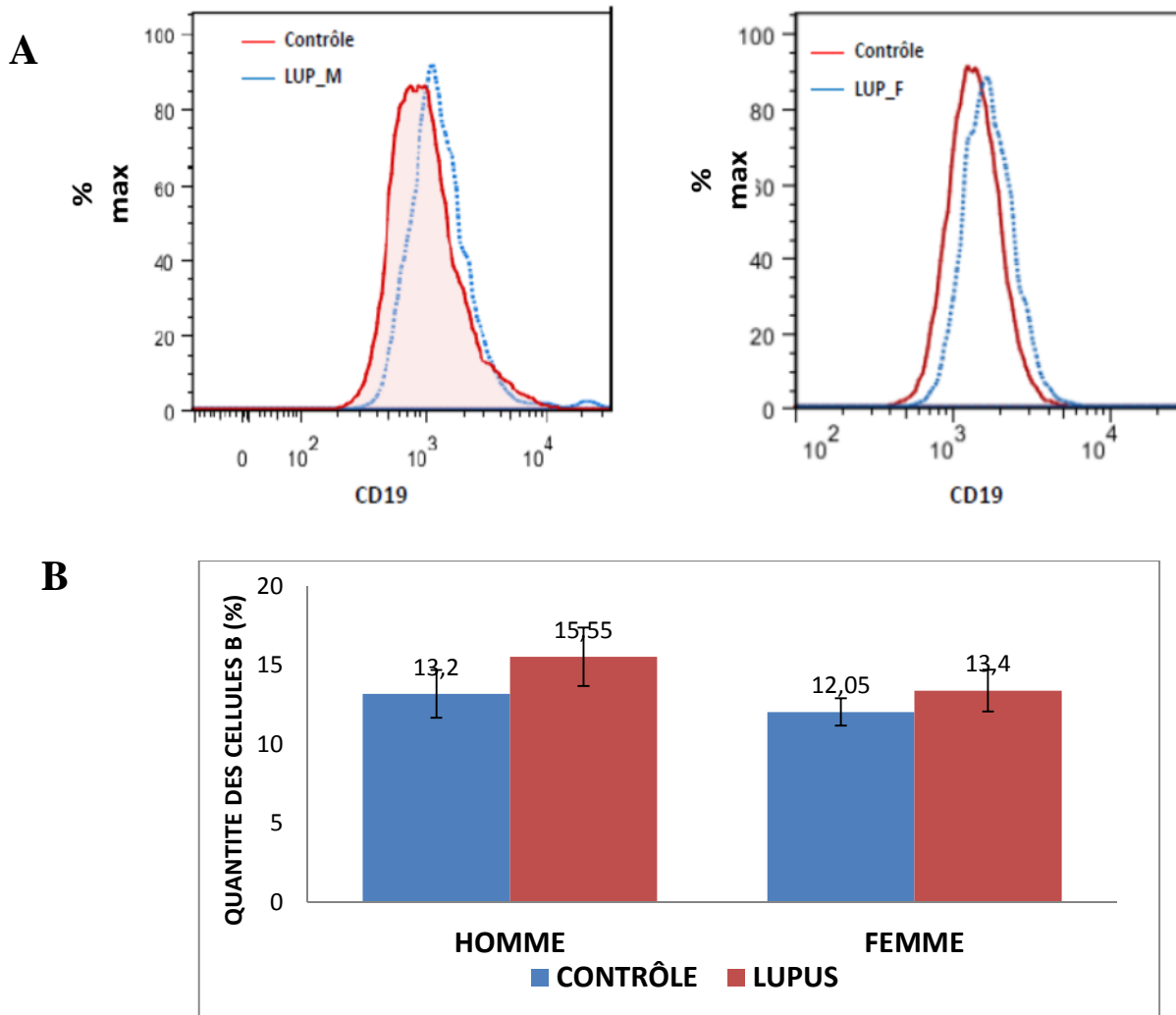
**Figure-19** : Immuno-marquage des Lymphocytes B CD19 chez les patients versus contrôles.

: **A**- Résultat représentatif de l'immuno-marquage des LB chez les patients lupique versus contrôles. **B**-moyenne et écart-type des pourcentages de présence des cellules B chez les patients ainsi que les contrôles.

La Figure-19 montre une légère augmentation d'environ 2% de la production des lymphocytes B (CD19+) chez les patients lupique par rapport aux contrôles sains. La valeur moyenne est évaluée à environ 14.48 %. Alors que chez les contrôles elle est de 12.63% du total des lymphocytes B sanguin. Le test statistique ANOVA a donné une p-value < 0.001, de

ce faite les variations dans la présence des LB observées entre les contrôles et patients sont statistiquement significative.

### 1.2.4 Variation de la quantité des lymphocytes B CD19+ dans le sang des patients lupiques en fonction du sexe :



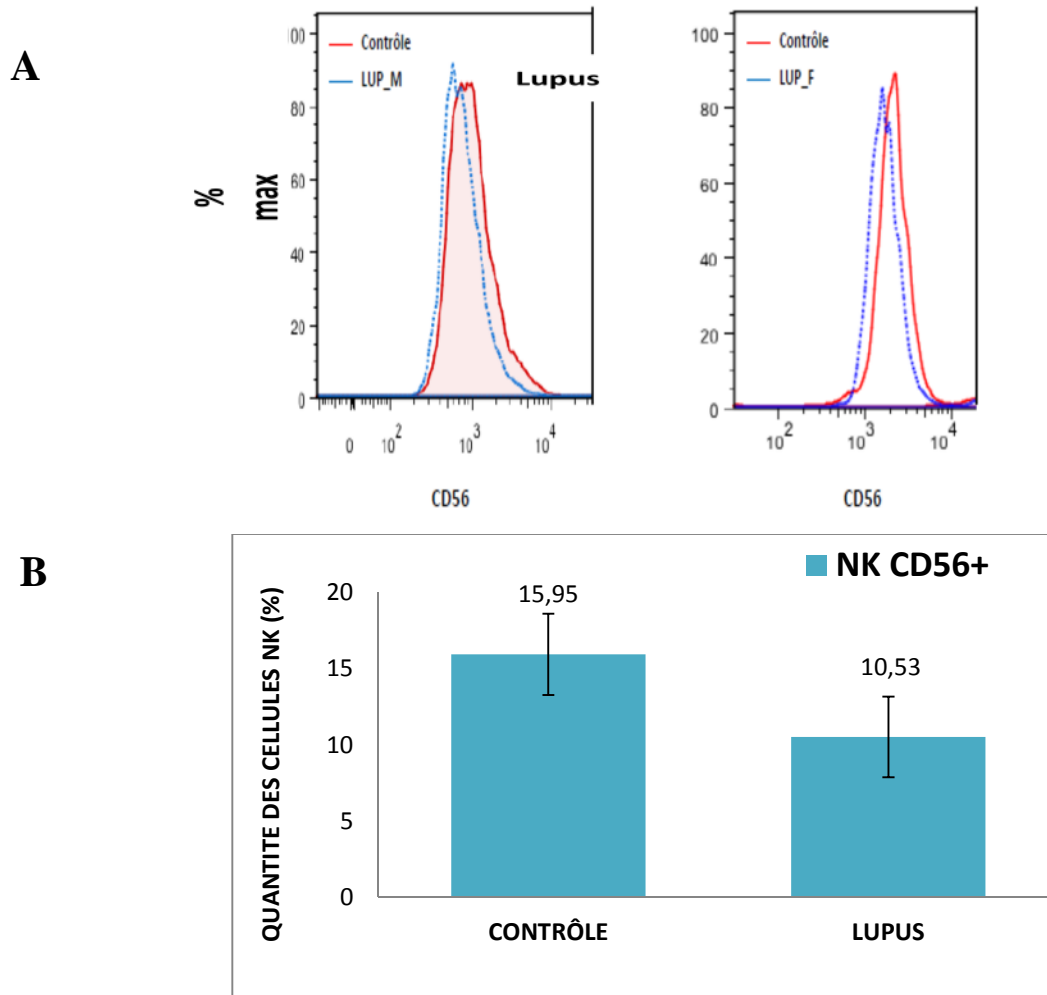
**Figure-20** : Immuno-marquage des Lymphocytes B CD19+ chez les patients lupique versus contrôles sains en fonction du sexe.

**A-** Résultat représentatif de l'immuno-marquage des LB chez les patients lupique versus contrôles en fonction du sexe. **B-** moyenne et écart-type des pourcentages de présence des cellules B chez les patients lupique ainsi que les contrôles en fonction du sexe.

Le suivi de la quantité de lymphocytes B produite chez les patients lupique en fonction du sexe est représenté sur la Figure-20. le diagramme ne montre pas de variation remarquable entre les patients lupique males ou femelles. Les patients males affichent une augmentation de 2.35 % par rapport au contrôles alors les femmes lupiques cette variation demeure inférieure

et situé à 1,35%. De ce fait on peut conclure que l'apport du LB lors de la maladie du Lupus ne peut pas être attribué à cette légère augmentation du nombre de LB présent dans le sang. D'autres études plus approfondies sont nécessaires, notamment l'analyse de la variation des différentes sous-populations lymphocytaires B.

### 1.2.5. Quantification des cellules NK (CD56+/CD3-) chez les patients lupiques

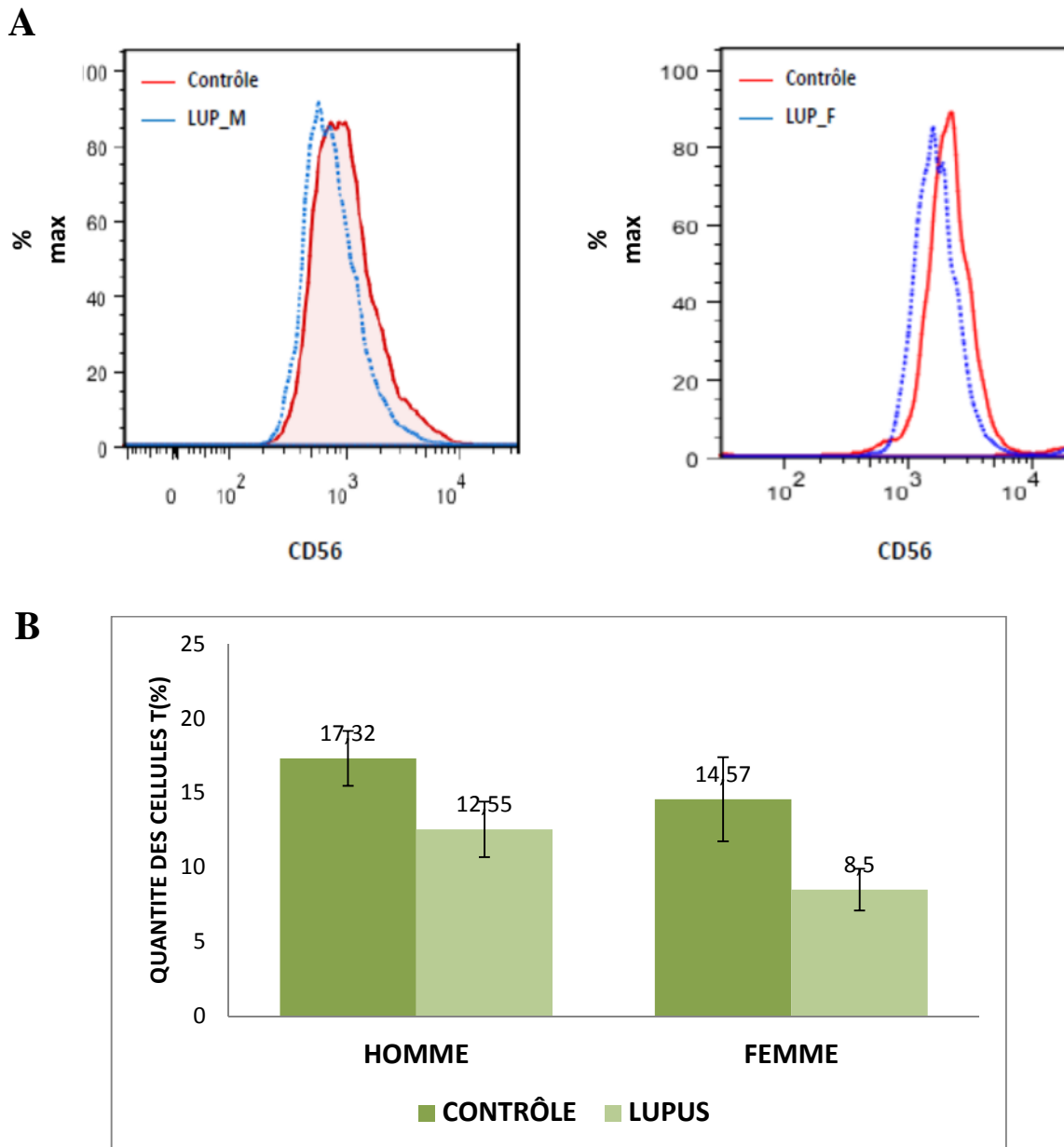


**Figure-21** : Immuno-marquage des cellules Natural Killer (NK) chez les patients lupiques versus contrôles sains. Avec : A- Résultat représentatif de l'immuno-marquage des NK chez les patients lupiques versus contrôles. B- moyenne et écart-type des pourcentages de présence des cellules NK chez les patients ainsi que les contrôles.

La quantification des cellules NK chez les patients lupiques versus contrôle montre une importante réduction du taux des NK dans le sang périphérique des patients par rapport aux contrôles. Cette réduction est évaluée en moyenne à plus de 5% du total des lymphocytes sanguins. Ce qui représente presque un tiers de la population NK. Cette réduction va avoir sans doute de graves répercussions sur les défenses immunitaires innées assurées par les cellules NK voir résultats sur la Figure 21. Le test statistique ANOVA a donné une p-value < 0.001, de

ce faite les variations dans la présence des NK observées entre les contrôles et patients sont statistiquement très significative.

### 1.2.6. Variation de la quantité des cellules NK (CD56+/CD3-) dans le sang des patients lupiques en fonction du sexe



**Figure-22** : Immuno-marquage des cellules Naturel Killer (NK) chez les patients lupique versus contrôles sains en fonction du sexe : A- Résultat représentatif de l’immuno-marquage des cellules Naturel Killer (NK) chez les patients lupique versus contrôles en fonction du sexe. B-moyenne et écart-type des pourcentages de présence des cellules NK chez les patients lupique ainsi que les contrôles sains en fonction du sexe.

L'étude de la variation de la quantité des cellules NK en fonction du sexe sur la Figure 22 montre que les patientes lupique présentent une diminution assez accentué comparé aux patients lupique. Cette réduction chez les femmes lupique atteint en moyenne la valeur de 8.5 % alors que les contrôles sont à 14.57 %. Encore une fois, les femmes lupiques sont plus vulnérables à l'immuno-pathologie de la maladie du lupus.

### **1.3. Discussion des résultats des immuno-marquage des cellules NK, LT et LB**

A partir des différents résultats générée par notre étude d'immuno-marquage des LT, LB et NK, Nous avons observés une augmentation accentué du nombre des lymphocytes T CD3 ainsi qu'une légère augmentation des LB CD19 et une nette diminution des cellules NK CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> chez les patients lupiques comparés avec des contrôles sains a été constatée. L'augmentation des cellules T dans le lupus a été clairement démontrés, en effet les cellules dendritiques de façon anormale exercent une pression activatrices sur ces cellules T. également la présence excessive d'auto-antigènes peut alors induire l'activation des cellules T auto-réactive(Blanco et al., 2001, Walters et al., 2009). La cytokine interféron  $\alpha$  produite principalement par les cellules dendritiques, joue un rôle majeur pathogénique dans le LES en activant les cellules B et cellules T. Cette surproduction des LT participe directement à l'activation du système immunitaire et favorise l'auto-immunité.

La légère augmentation du nombre des cellules B CD19 dans le lupus explique en partie leur rôle essentiel dans le développement de LES(Anolik et al., 2003). Les LB CD19 constituent la cellule précurseur des cellules sécrétrices d'auto-anticorps pathogène. Cependant, l'activation des cellules B auto-réactive débute quand lors de l'augmentation du processus d'apoptose et formation des complexes immunes (Cohen-Solal et al., 2008, McGonagle et McDermott, 2006). Les cellules LB des patients lupiques ont la particularité d'exprimer à leurs surface la molécule CD40L ce qui n'est pas le cas chez les individus normaux; ils ont donc la possibilité de s'activer sans passer par le contact avec les cellules T (Grammer et al., 2003).Pour explorer au mieux la contribution des LB dans le lupus, d'autres études complémentaires nécessite d'être menées notamment en relation avec les études des états d'activation des LB et suivre la répartition des différentes sous-population LB.

La diminution du nombre des cellules NK CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> dans le sang chez les patients lupiques en comparant aux sujets contrôles a été mis en évidence par plusieurs équipes et de façon répétitive, une diminution du nombre des cellules NK associé à une réduction des

fonctions cytotoxiques, cette réduction doit être mis en parallèle avec le rôle joué par les facteurs environnementaux, et notamment les infections virales dans le déclenchement du LES (Erkeller-Yusel et al., 1993, Yabuhara et al., 1996). Et cette anomalie quantitative est associée à une diminution qualitative puisque la cytotoxicité des cellules NK est également diminuée. Certains travaux suggèrent que la diminution des cellules NK serait liée directement à un excès d'apoptose de ces cellules (Momot et al., 2006)

## 2. Détection et quantification des auto-anticorps anti-nucléaire chez 25 patients LES

Afin de mieux explorer le rôle des lymphocytes B lors de la pathologie du lupus, nous nous sommes intéressés au suivi de l'état d'activation des cellules B et ceci par la détection et l'identification des différents auto-anticorps nucléaires qui sont responsables des nombreuses complications associées à la maladie du LES. Cette analyse nous l'avons réalisée sur 25 patients atteints de cette maladie.

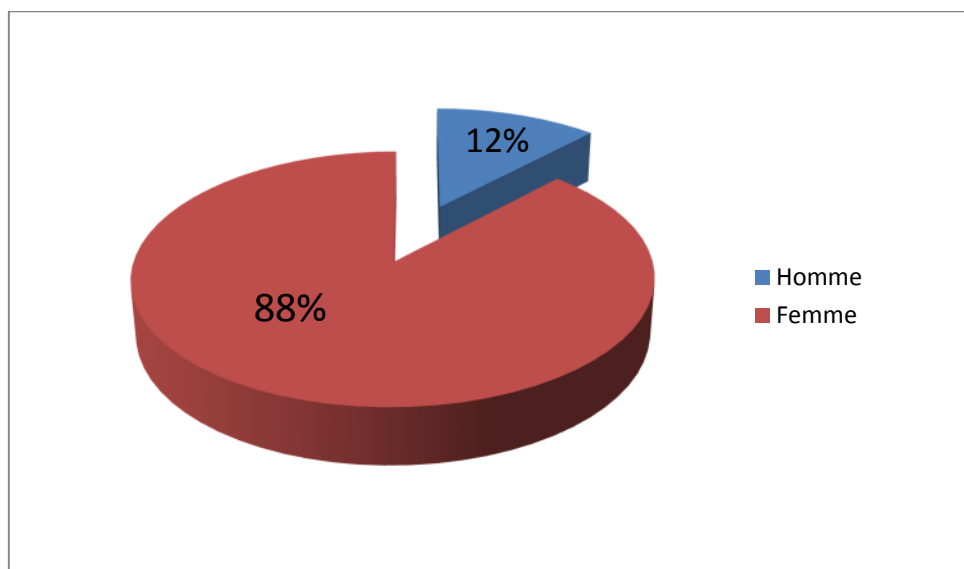
**Tableau VIII** : Tableau Résume les résultats d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA des patients :

	sexe	Age (année)	IFI (FAN)	ELISA	
				Anti-ADN (UI /ml)	Anti-ENA
1	Femme	57	Moucheté	156	Sm/RNP Sm SSA SSB
2	Homme	36	Moucheté Homogène	446	Sm /RNP SSA SSB
3	Femme	32	Moucheté	107	Sm/RNP Sm SSA
4	Femme	25	Moucheté	110	SSA
5	Femme	56	Moucheté Homogène	786	Sm/RNP Sm SSA
6	Homme	18	Moucheté	221	Sm/RNP SSA
7	Homme	50	Moucheté Homogène	278	SSA SSB

8	Femme	28	Moucheté	< 100	Sm/RNP
9	Femme	53	Moucheté	< 100	SSA
10	Femme	63	Moucheté Homogène Nucléolaire	249	SSA SSB
11	Femme	60	Moucheté	260	Sm/RNP Sm SSA SSB
12	Femme	45	Moucheté	< 100	SSA SSB
13	Femme	39	Moucheté	< 100	Sm/RNP Sm SSA SSB
14	Femme	63	Homogène Centromérique Moucheté	420	
15	Femme	24	Moucheté Homogène	374	Sm/RNP Sm SSA
16	Femme	50	Moucheté Homogène	120	Sm/RNP Sm
17	Femme	41	Moucheté	267	SSA
18	Femme	33	Moucheté Homogène	434	SSA SSB
19	Femme	37	Homogène	>800	Sm/RNP Sm SSA
20	Femme	30	Moucheté	128	SSA SSB
21	Femme	30	Homogène	>800	
22	Femme	48	Homogène	280	
23	Femme	20	Moucheté	< 100	Sm/RNP Sm SSA
24	Femme	27	Moucheté	< 100	Sm/RNP SSA
25	Femme	32	Homogène	< 100	

## 2.1. Etude épidémiologique

### 2.1.1. Répartition des patients selon le sexe

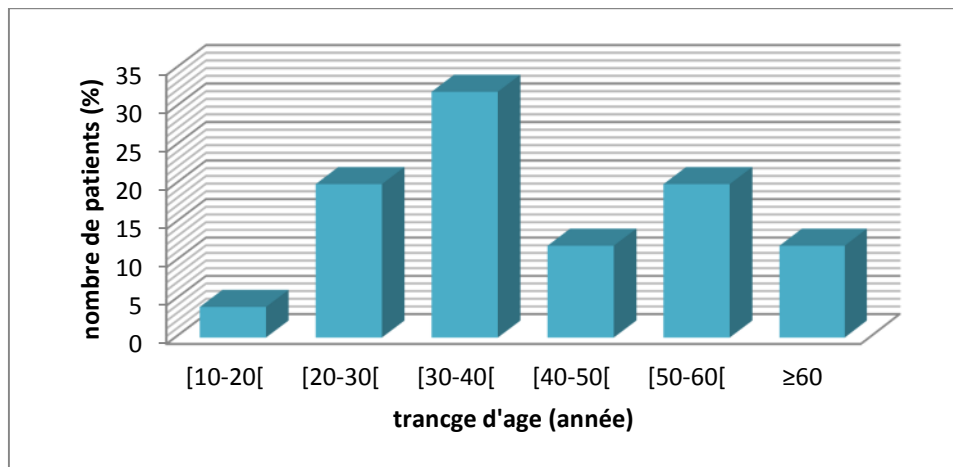


**Figure-23** : Représentation de la répartition des patients lupique selon le sexe.

Parmi les 25 patients de notre série, 22 étaient du sexe féminin avec un pourcentage de 88%, contre 3 patients du sexe masculin qui représentent seulement 12%, avec un sex-ratio F/H de 7.33. Nos résultats confirment la prédominance de la maladie chez la femme avec un sex-ratio F/H de 7.33. La prédominance féminine dans le lupus est admise par la plus part des auteurs (Hachulla et Launay, 2007, Kyttaris, 2010). Des études réalisées en Maroc par *Dadoui et al*, (2016) ont aussi reporté une prédominance, féminine chez les patients lupiques avec un sex-ratio de 6.6, ce qui est en accord avec nos résultats.

La prédominance féminine dans cette maladie est expliquée par l'influence des facteurs hormonaux sur le système immunitaire. En effet, les œstrogènes plus particulièrement peuvent aggraver le SLE en prolongeant la survie des cellules auto-immunes, en augmentant la production de cytokines de type 2 (Th2) et en stimulant les cellules B pour produire des auto-anticorps (Mok et Lau, 2003).

### 2.1.2. Répartition des patients par tranche d'âge



**Figure-24** : Histogramme représentant la répartition des patients par tranche d'âge.

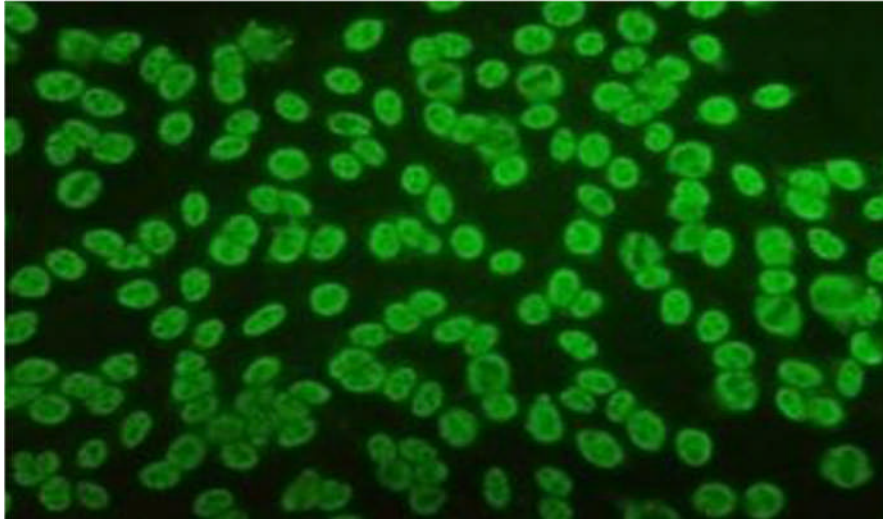
Notre série est composée de 25 patients dans l'âge varie de 18 à 63 ans avec une moyenne d'âge de 39.88 ans. La tranche d'âge située de 30 à 40 ans est la plus touchée avec un pourcentage de 32%. La tranche située entre 20 à 30 ans et 50 à 60 ans représente 20% des patients, et seulement 4% pour la tranche inférieure à 20 ans.

### 2.2. Détection des anticorps anti nucléaires par la technique d'Immunofluorescence indirecte sur la lignée de cellules humaine Hep2 :

La recherche de la présence des auto-anticorps est effectuée sur les cellules Hep2 exprimant par transfection des différents antigènes cibles des AAN. Ces cellules sont fixées sur des lames. Les aspects de la fluorescence du noyau des cellules Hep2 générés au cours du procédé sont spécifiques au type d'auto-anticorps présents dans l'échantillon. Ainsi on distingue quatre aspects principaux décrits pour la fluorescence du noyau qui sont les suivants :

#### ➤ Aspect homogène

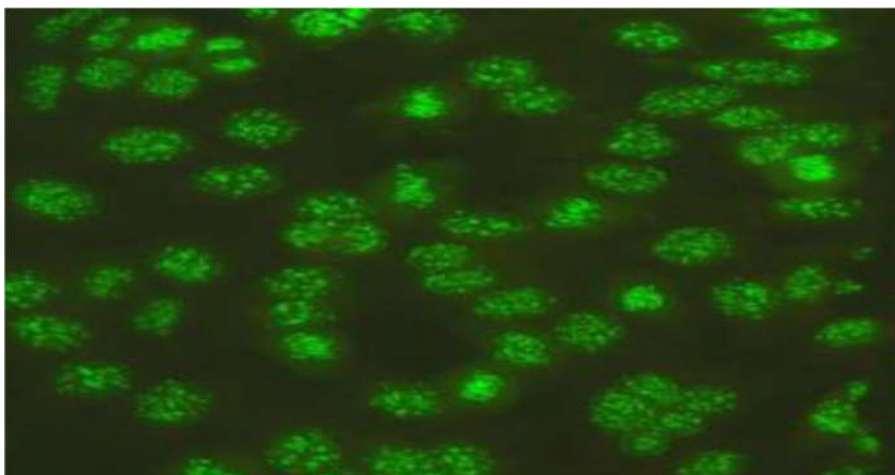
La figure 25 montre l'aspect de la fluorescence dit homogène et uniforme qui diffuse de l'ensemble du noyau des cellules Hep-2, ce type de fluorescence indique la présence des anticorps anti-ADN qui sont caractéristiques au lupus LES.



**Figure-25** : Image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect d'homogène de la fluorescence. (Grossissement: X 20)

➤ **Aspect moucheté**

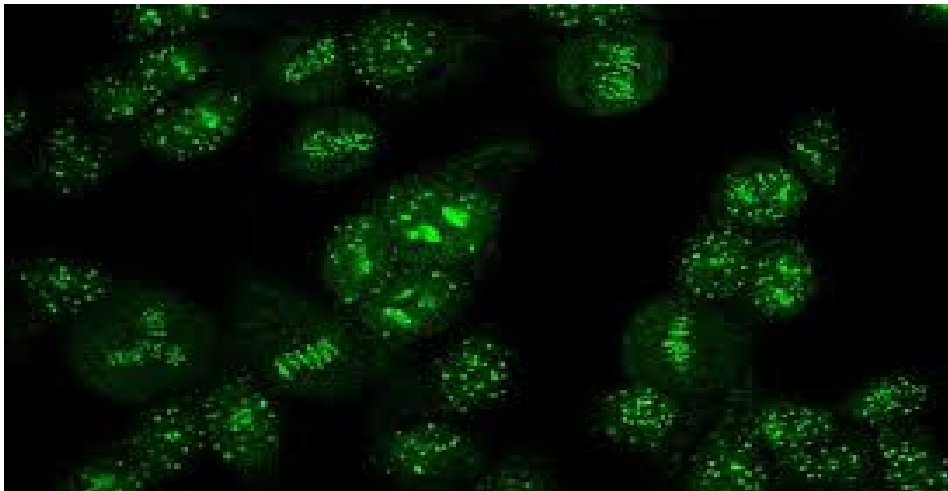
Comme le montre la figure 26 l'aspect de la fluorescence en moucheté sous forme de taches ou de grains fins et isolés provenant des noyaux de cellules au repos et d'autres taches dense que présentent les cellules eu cours de division cellulaire, ce type de fluorescence provient essentiellement des auto-anticorps nucléaire solubles et indique la présence des anticorps anti-RNP, Sm, SSA, SSB, Scl70, qui sont fréquent dans le cas du lupus, ainsi que d'autres maladies auto-immunes.



**Figure-26** : image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect moucheté.(Grossissement X 20).

➤ **Aspect centromérique**

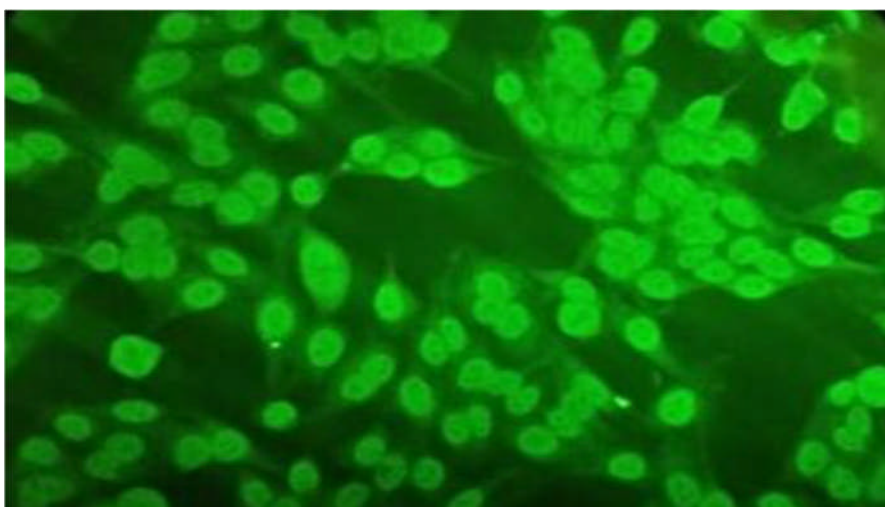
La Figure 27 Montre des mouchetures discrètes qui s'alignent avec les chromosomes en métaphase, cette aspect est appelé aspect centromérique, indique la présence des anticorps anti-centromère qui s'associent aux syndromes de CREST, mais très rarement au LES.



**Figure-27** : image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect centromérique.(Grossissement X 20)

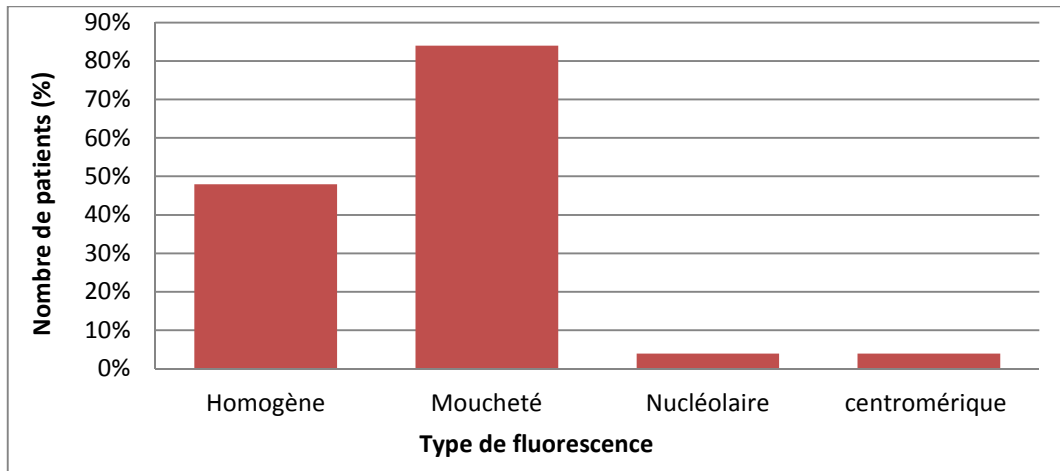
➤ **Aspect nucléole**

La Figure 28 montre un profil de fluorescent homogène dans le noyau des cellules, ainsi que des marquages moucheté des nucléoles, cette aspect est associée au syndrome de Sclérodémie, et plus rarement au lupus.



**Figure-28** : Image de microscopie de fluorescence représentant l'aspect nucléolaire (Grossissement: X 20).

### 2.2.1 Répartition des Aspects de la fluorescence chez les patients LES



**Figure-29** : Histogramme représentant la répartition des aspects de la fluorescence provenant des noyaux des cellules Hep2.

La recherche des anticorps anti-nucléaire (AAN) a été réalisée chez 25 patients, et elle était positive à la totalité des patients (100%). L'aspect moucheté était retrouvé chez la plus part des patients atteignant un pourcentage de 84%. Il est la caractéristique de la présence prédominante d'auto-anticorps nucléaire soluble. L'aspect homogène qui est le marqueur de la présence d'auto-anticorps anti ADN double brin est estimé à 48%, et enfin seulement 4% des patients présentent un aspect nucléolaire et centromérique de la fluorescence.

L'analyse de l'aspect de fluorescence permet d'orienter souvent vers la détection spécifique des auto-anticorps présent chez un patient et de faite se diriger vers les tests d'identification plus précis. Pour cette finalité on utilise la technique de dosage ELISA pour la recherche spécifique des auto-anticorps nucléaire anti-dsDNA et l'ANA solubles à consulter Tableau IX.

**Tableau IX** : représentation des différents aspects de fluorescence rencontrés en fonction des différents auto-anticorps évoqués des cellules Hep2 et pathologies associées.

Aspect de la fluorescence	Les auto-anticorps associés	Pathologie associé
Homogène	Anti-ADN natif	LES
Moucheté	Anti-RNP, anti-Sm, anti-SSA, anti-SSB, anti-Sc170	connectivitemixte, LES
Centromérique	Anti-centromère	Syndrome de CREST, LES
Nucléolaire	anti-Sc1-70	Sclérodémie, LES

### **2.3. Dosage ELISA des Anticorps anti-nucléaires**

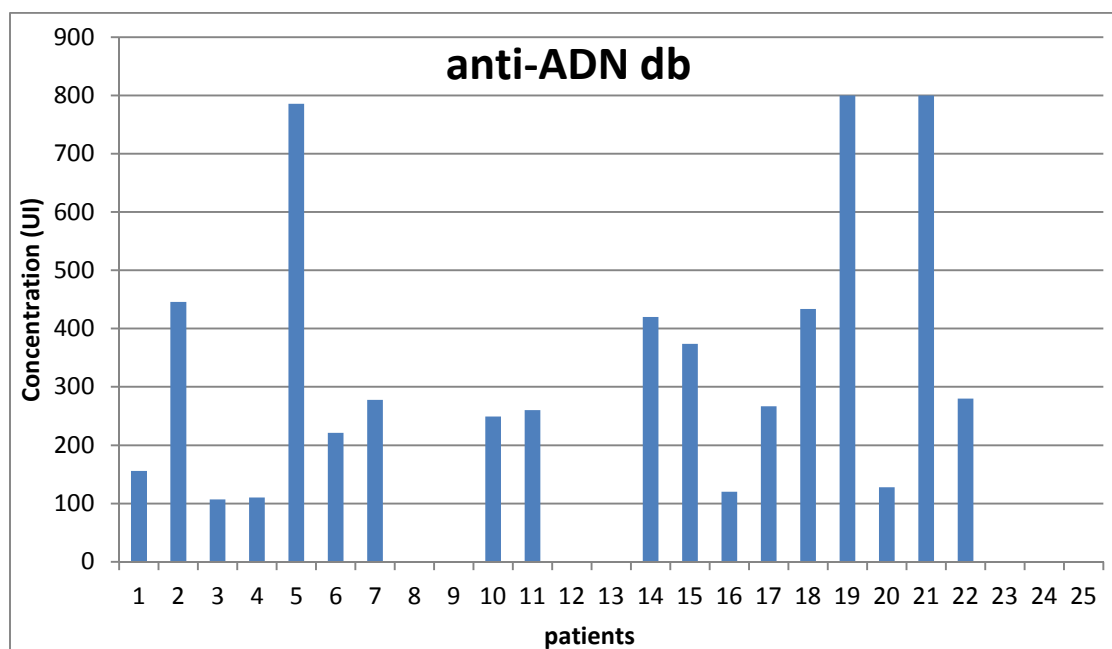
#### **2.3.1 Dosage des anti-dsDNA de forte affinité (de type IgG)**

La mesure des concentrations d'auto-anticorps dans les sérum des patients et exprimée en UI/ml est estimée grâce à la courbe d'étalonnage réalisé avec un standard de référence fourni dans le kit Elisa EUROIMMUN que sont les trois calibrateurs (1,2 et 3) comme le montre le tracé la courbe d'étalonnage sur la Figure 2 mise en annexe. Les calibrateurs (1, 2 et 3) sont inclus pour fournir des valeurs quantitatives exactes en [IU/ml] pour les échantillons des patients et doivent être utilisés à chaque dosage Elisa des AAN.

A partir de l'équation de la courbe de tendance (Figure-2 en annexe)  $Y=0.001X+ 0.106$ , nous avons pu déterminer les concentrations des auto-anticorps anti-ADNdb dans les sérums de patients effectuée avec la technique Elisa. D'une manière générale, la valeur de détermination de la présence d'AAN est fixée au préalable par les laboratoires qui chacun fixe ses propres valeurs seuil, ainsi la limite maximale de la gamme normale recommander par EUROIMMUN est estimée à 100 UI/ml : de la :

**< 100 UI/ml : échantillon négatif.**

**≥ 100UI/ml : échantillon positif.**

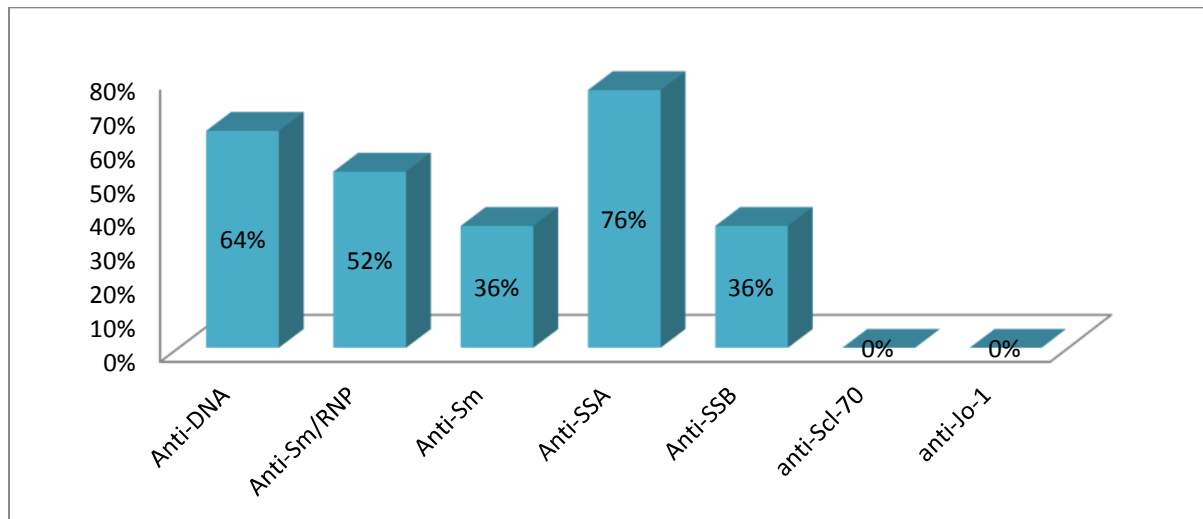


**Figure-30** : Histogramme représentant les résultats du dosage Elisa des anticorps anti-nucléaires anti-ADNdb chez les patients lupique.

Selon le type de fluorescence observé par la méthode d'IFI, on oriente la spécificité d'anticorps ciblé pendant le test d'identification. Dans ce cas on a utilisé la technique d'ELISA qui permet l'identification des anticorps anti-ADN natif et des anticorps anti-antigènes nucléaire soluble. Dans un premier temps nous avons réalisé un dosage Elisa des anticorps anti-ADN natif, représente le marqueur sérologique le plus classique de LES selon (Servais et al., 2009). Le résultat obtenu montre une présence de ce type d'auto-anticorps dans 64 %. 20 des cas affiche de forte concentration en ADN db, valeurs > 400UI. Le titre des anticorps est proportionnel à l'apparition de l'activité de la maladie lupique et atteinte d'organes. Ainsi une concentration élevée de ces auto-anticorps précèdent l'apparition des manifestations hématologiques et clinique (voir rénales), ce qui nécessite une surveillance rapprochée du patient. En revanche, 4 patients présentent un taux très faible en ce type d'AAN.

Cette diminution de la concentration des anti-ADN natif ou bien leur absence dans le sérum apparait généralement dans une phase de décroissance thérapeutique. Néanmoins cette absence d'auto-anticorps peut être transitoire. L'examen d'autres facteurs est recommandé.

### 2.3. 2. Recherche d'auto-anticorps nucléaires solubles par la technique Elisa



**Figure-31** : Histogramme représentant la répartition des patients selon le type d'auto-anticorps.

Les anticorps anti-SSA représente le type prédominant chez les patients lupique avec un pourcentage de 76%. Suivi des anticorps anti-DNA avec 64% et anti-Sm/RNP avec 52%. Par contre les anticorps anti-Sm et anti-SSB était positif chez 36% des cas. On note l'absence des deux anticorps (anti-Scl-70 et anti-Jo-1) chez l'ensemble les patients.

Nos résultats montrent que les anticorps anti-SSA constituent le type d'anticorps le plus abondant, ce type d'anticorps présent chez presque la totalité des patients lupique et on le retrouve beaucoup plus chez patients atteints lupus spontanés et lupus cutané subaigu (Amoura, 2012). D'autre part les anticorps anti Sm/RNP représentent 52% de nos patients, ces anticorps sont dirigés contre les protéines faisant partie d'un sous-groupe de ribonucléoprotéines. La recherche de ces types d'anticorps et la connaissance de leur taux de présence constituent des informations appréciables pour le suivi et le diagnostic des patients.

# Conclusion

## Conclusion et perspectives

Lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune non spécifique d'organe, dont les causes précises restent inconnues. La prédominance de cette maladie chez les jeunes femmes explique le rôle des œstrogènes dans le développement de lupus. L'excès de l'apoptose induit l'accumulation de débris cellulaires. Cet excès cause une activation des lymphocytes T auto-réactifs qui contrôlent à leur tour l'hyper-activation des lymphocytes B et la sécrétion d'auto-anticorps. Cette dérégulation fonctionnelle du lymphocyte B est à l'origine de la production d'auto-anticorps.

En effet, les analyses sérologiques par immunofluorescence indirecte nous ont permis de déterminer la présence des anticorps anti-nucléaires (AAN) chez tous les patients. Les tests Elisa nous ont permis de quantifier les anticorps anti-ADN natif chez les patients.

Cependant, l'anticorps anti-SSA constitue le type d'anticorps le plus abondant suivi de l'anticorps anti-ADN et l'anticorps anti-Sm/RNP. L'interaction de ses auto-anticorps avec les auto-antigènes forme le complexe immunitaire qui constitue les facteurs aggravateurs de la maladie du lupus. Plusieurs stratégies thérapeutiques qui ciblent notamment les lymphocytes B et différentes cytokines sont en cours de développement.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une étude consacrée à l'évaluation de la contribution des lymphocytes B à la maladie lupique. De ce fait comme nous l'avons signalé précédemment, le suivi de l'état d'hyper-activation de la population LB est plus que nécessaire pour une meilleure compréhension de la pathologie. La détermination de la proportion de présence des sous-populations de lymphocytes B tel que les LB (naïfs: CD27<sup>-</sup>, activés: CD24<sup>+</sup> et régulatrice: CD24<sup>+</sup>) peut être très informative. De même le dosage des cytokines IL-10 et INF- $\alpha$  chez les patients lupiques peut être intéressant pour déterminer les différences de l'état d'activation des LB des patients, et encore suivre les corrélations de ces facteurs avec la présence ou pas d'une activité de la maladie lupique.

# Références

## Références bibliographique

- Amoura, Z., Arnaud, L. and Mathian, A. (2012) 'Un modèle d'immunisation foeto-maternelle : le lupus néonatal ?', *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, 196 (8), pp. 1625-1637.
- Anolik, J., Sanz, I. and Looney, R. J. (2003) 'B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus', *Curr Rheumatol Rep*, 5(5), pp. 350-6.
- Baline, K., Zaher, K., Fellah, H. and Benchikhi, H. (2015) '[Systemic lupus and kidney disease: contribution of anti-SSA]', *Pan Afr Med J*, 20, pp. 39.
- Banchereau, J. and Pascual, V. (2006) 'Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases', *Immunity*, 25(3), pp. 383-92.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V. and Banchereau, J. (2001) 'Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus', *Science*, 294(5546), pp. 1540-3.
- Blanco, P., Pitard, V., Viallard, J. F., Taupin, J. L., Pellegrin, J. L. and Moreau, J. F. (2005) 'Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus', *Arthritis Rheum*, 52(1), pp. 201-11.
- Bonnotte, B. (2010) '[Pathogenic mechanisms of autoimmune diseases]', *Rev Med Interne*, 31 Suppl 3, pp. S292-5.
- Caponi, L., Chimenti, D., Pratesi, F. and Migliorini, P. (2002) 'Anti-ribosomal antibodies from lupus patients bind DNA', *Clin Exp Immunol*, 130(3), pp. 541-7.
- Carmona-Fernandes, D., Santos, M. J., Canhao, H. and Fonseca, J. E. (2013) 'Anti-ribosomal P protein IgG autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus: diagnostic performance and clinical profile', *BMC Med*, 11, pp. 98.
- Chan, E. K., Damoiseaux, J., Carballo, O. G., Conrad, K., de Melo Cruvinel, W., Francescantonio, P. L., Fritzler, M. J., Garcia-De La Torre, I., Herold, M., Mimori, T., Satoh, M., von Muhlen, C. A. and Andrade, L. E. (2015) 'Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014-2015', *Front Immunol*, 6, pp. 412.
- Chan, T. D., Wood, K., Hermes, J. R., Butt, D., Jolly, C. J., Basten, A. and Brink, R. (2012) 'Elimination of germinal-center-derived self-reactive B cells is governed by the location and concentration of self-antigen', *Immunity*, 37(5), pp. 893-904.
- Chaplin, D. D. (2010) 'Overview of the immune response', *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), pp. S3-23.
- Choi, J., Kim, S. T. and Craft, J. (2012) 'The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update', *Curr Opin Immunol*, 24(6), pp. 651-7.

- Cohen-Solal, J. F., Jeganathan, V., Hill, L., Kawabata, D., Rodriguez-Pinto, D., Grimaldi, C. and Diamond, B. (2008) 'Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus', *Lupus*, 17(6), pp. 528-32.
- Cojocaru, M., Cojocaru, I. M., Silosi, I. and Vrabie, C. D. (2011) 'Manifestations of systemic lupus erythematosus', *Maedica (Buchar)*, 6(4), pp. 330-6.
- Costanzo, A., Chimenti, M. S., Botti, E., Caruso, R., Sarra, M. and Monteleone, G. (2010) 'IL-21 in the pathogenesis and treatment of skin diseases', *J Dermatol Sci*, 60(2), pp. 61-6.
- Couzi, L., Merville, P., Deminiere, C., Moreau, J. F., Combe, C., Pellegrin, J. L., Viillard, J. F. and Blanco, P. (2007) 'Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis', *Arthritis Rheum*, 56(7), pp. 2362-70.
- Crow, M. K., Olfieriev, M. and Kirou, K. A. (2015) 'Targeting of type I interferon in systemic autoimmune diseases', *Transl Res*, 165(2), pp. 296-305.
- Dadoui, S. (2016) 'Profil épidémiologique, clinique, biologique et thérapeutique du lupus érythémateux systémique'. [Thèse].Maroc :Université Sidi Mohammed Ben Abdellah.Fes
- Elantak, L., Espeli, M., Boned, A., Bornet, O., Bonzi, J., Gauthier, L., Feracci, M., Roche, P., Guerlesquin, F. and Schiff, C. (2012) 'Structural basis for galectin-1-dependent pre-B cell receptor (pre-BCR) activation', *J Biol Chem*, 287(53), pp. 44703-13.
- Erkeller-Yusel, F., Hulstaart, F., Hannet, I., Isenberg, D. and Lydyard, P. (1993) 'Lymphocyte subsets in a large cohort of patients with systemic lupus erythematosus', *Lupus*, 2(4), pp. 227-31.
- Flower, C., Hennis, A. J., Hambleton, I. R., Nicholson, G. D., Liang, M. H. and Barbados National Lupus Registry, G. (2012) 'Systemic lupus erythematosus in an African Caribbean population: incidence, clinical manifestations, and survival in the Barbados National Lupus Registry', *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 64(8), pp. 1151-8.
- Fu, S. M., Dai, C., Zhao, Z. and Gaskin, F. (2015) 'Anti-dsDNA Antibodies are one of the many autoantibodies in systemic lupus erythematosus', *F1000Res*, 4(F1000 Faculty Rev), pp. 939.
- Grammer, A. C., Slota, R., Fischer, R., Gur, H., Girschick, H., Yarboro, C., Illei, G. G. and Lipsky, P. E. (2003) 'Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions', *J Clin Invest*, 112(10), pp. 1506-20.
- Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., Bret, C., Duperray, C., Hose, D. and Klein, B. (2009) 'An *in vitro* model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization', *Blood*, 114(25), pp. 5173-81.

- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M. K., Touma, Z., Urowitz, M. B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G. and Hughes, G. (2016) 'Systemic lupus erythematosus', *Nat Rev Dis Primers*, 2, pp. 16039.
- Kyttaris, V. C. (2010) 'Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage', *Methods Mol Biol*, 662, pp. 265-83.
- Lagresle-Peyrou, C., Millili, M., Luce, S., Boned, A., Sadek, H., Rouiller, J., Frange, P., Cros, G., Cavazzana, M., Andre-Schmutz, I. and Schiff, C. (2014) 'The BLNK adaptor protein has a nonredundant role in human B-cell differentiation', *J Allergy Clin Immunol*, 134(1), pp. 145-54.
- Le Thi Huong, D., Wechsler, B. and Piette, J. C. (2008) '[Pregnancy and systemic lupus erythematosus]', *Rev Med Interne*, 29(9), pp. 725-30.
- LeBien, T. W. and Tedder, T. F. (2008) 'B lymphocytes: how they develop and function', *Blood*, 112(5), pp. 1570-80.
- Luning Prak, E. T., Monestier, M. and Eisenberg, R. A. (2011) 'B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity', *Ann N Y Acad Sci*, 1217, pp. 96-121.
- Manson, J. J. and Rahman, A. (2006) 'Systemic lupus erythematosus', *Orphanet J Rare Dis*, 1, pp. 6.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends Immunol*, 25(12), pp. 677-86.
- Marshak-Rothstein, A. and Rifkin, I. R. (2007) 'Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease', *Annu Rev Immunol*, 25, pp. 419-41.
- Mathian, A., Arnaud, L. and Amoura, Z. (2014) '[Physiopathology of systemic lupus erythematosus: a 2014 update]', *Rev Med Interne*, 35(8), pp. 503-11.
- McGonagle, D. and McDermott, M. F. (2006) 'A proposed classification of the immunological diseases', *PLoS Med*, 3(8), pp. e297.
- Mikdashy, J. and Nived, O. (2015) 'Measuring disease activity in adults with systemic lupus erythematosus: the challenges of administrative burden and responsiveness to patient concerns in clinical research', *Arthritis Res Ther*, 17, pp. 183.
- Mok, C. C. and Lau, C. S. (2003) 'Pathogenesis of systemic lupus erythematosus', *J Clin Pathol*, 56(7), pp. 481-90.
- Momot, T., Schmidt, R. E. and Witte, T. (2006) 'Regulation of killer immunoglobulin-like receptors in systemic lupus erythematosus', *J Rheumatol*, 33(5), pp. 1029.
- Moura Filho, J. P., Peixoto, R. L., Martins, L. G., Melo, S. D., Carvalho, L. L., Pereira, A. K. and Freire, E. A. (2014) 'Lupus erythematosus: considerations about clinical, cutaneous and therapeutic aspects', *An Bras Dermatol*, 89(1), pp. 118-25.

- Nashi, E., Wang, Y. and Diamond, B. (2010) 'The role of B cells in lupus pathogenesis', *Int J Biochem Cell Biol*, 42(4), pp. 543-50.
- Oke, V. and Wahren-Herlenius, M. (2013) 'Cutaneous lupus erythematosus: clinical aspects and molecular pathogenesis', *J Intern Med*, 273(6), pp. 544-54.
- Petri, M., Orbai, A. M., Alarcon, G. S., Gordon, C., Merrill, J. T., Fortin, P. R., Bruce, I. N., Isenberg, D., Wallace, D. J., Nived, O., Sturfelt, G., Ramsey-Goldman, R., Bae, S. C., Hanly, J. G., Sanchez-Guerrero, J., Clarke, A., Aranow, C., Manzi, S., Urowitz, M., Gladman, D., Kalunian, K., Costner, M., Werth, V. P., Zoma, A., Bernatsky, S., Ruiz-Irastorza, G., Khamashta, M. A., Jacobsen, S., Buyon, J. P., Maddison, P., Dooley, M. A., van Vollenhoven, R. F., Ginzler, E., Stoll, T., Peschken, C., Jorizzo, J. L., Callen, J. P., Lim, S. S., Fessler, B. J., Inanc, M., Kamen, D. L., Rahman, A., Steinsson, K., Franks, A. G., Jr., Sigler, L., Hameed, S., Fang, H., Pham, N., Brey, R., Weisman, M. H., McGwin, G., Jr. and Magder, L. S. (2012) 'Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus', *Arthritis Rheum*, 64(8), pp. 2677-86.
- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C. and Boulanger, C. M. (2012) 'Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation', *Cytotechnology*, 64(2), pp. 109-30.
- Pieper, K., Grimbacher, B. and Eibel, H. (2013) 'B-cell biology and development', *J Allergy Clin Immunol*, 131(4), pp. 959-71.
- Pillai, S., Mattoo, H. and Cariappa, A. (2011) 'B cells and autoimmunity', *Curr Opin Immunol*, 23(6), pp. 721-31.
- Ramanujam, M. and Davidson, A. (2008) 'Targeting of the immune system in systemic lupus erythematosus', *Expert Rev Mol Med*, 10, pp. e2.
- Ramos, P. S., Brown, E. E., Kimberly, R. P. and Langefeld, C. D. (2010) 'Genetic factors predisposing to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis', *Semin Nephrol*, 30(2), pp. 164-76.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S. and Hirai, H. (2003) 'Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development', *Immunity*, 18(5), pp. 675-85.
- Schleinitz, N., Vely, F., Harle, J. R. and Vivier, E. (2010) 'Natural killer cells in human autoimmune diseases', *Immunology*, 131(4), pp. 451-8.
- Scofield, R. H. and Oates, J. (2009) 'The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus', *Am J Med Sci*, 338(5), pp. 409-12.
- Servais, G., Karmali, R., Guillaume, M. P., Badot, V., Duchateau, J. and Corazza, F. (2009) 'Anti DNA antibodies are not restricted to a specific pattern of fluorescence on HEp2 cells', *Clin Chem Lab Med*, 47(5), pp. 543-9.

- Sthoeger, Z., Sharabi, A. and Mozes, E. (2014) 'Novel approaches to the development of targeted therapeutic agents for systemic lupus erythematosus', *J Autoimmun*, 54, pp. 60-71.
- Terrier, B. and Mouthon, L. (2013) '[Recombinant proteins or monoclonal antibodies: comparative properties and interest in systemic lupus erythematosus]', *Med Sci (Paris)*, 29(1), pp. 65-73.
- Toong, C., Adelstein, S. and Phan, T. G. (2011) 'Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis', *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 4, pp. 17-28.
- Tozzoli, R., Antico, A., Porcelli, B. and Bassetti, D. (2012) 'Automation in indirect immunofluorescence testing: a new step in the evolution of the autoimmunology laboratory', *Auto Immun Highlights*, 3(2), pp. 59-65.
- Tsokos, G. C. (2011) 'Systemic lupus erythematosus', *N Engl J Med*, 365(22), pp. 2110-21.
- Tsokos, G. C. (2016) 'Systemic lupus erythematosus in 2015: Cellular and metabolic requirements of effector T cells', *Nat Rev Rheumatol*, 12(2), pp. 74-6.
- Tsokos, G. C., Lo, M. S., Costa Reis, P. and Sullivan, K. E. (2016) 'New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus', *Nat Rev Rheumatol*, 12(12), pp. 716-730.
- Walters, E., Rider, V., Abdou, N. I., Greenwell, C., Svojanovsky, S., Smith, P. and Kimler, B. F. (2009) 'Estradiol targets T cell signaling pathways in human systemic lupus', *Clin Immunol*, 133(3), pp. 428-36.
- Yabuhara, A., Yang, F. C., Nakazawa, T., Iwasaki, Y., Mori, T., Koike, K., Kawai, H. and Komiyama, A. (1996) 'A killing defect of natural killer cells as an underlying immunologic abnormality in childhood systemic lupus erythematosus', *J Rheumatol*, 23(1), pp. 171-7.
- Yee, C. S., Farewell, V. T., Isenberg, D. A., Griffiths, B., Teh, L. S., Bruce, I. N., Ahmad, Y., Rahman, A., Prabu, A., Akil, M., McHugh, N., Edwards, C., D'Cruz, D., Khamashta, M. A. and Gordon, C. (2011) 'The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients', *Rheumatology (Oxford)*, 50(5), pp. 982-8.
- Yee, C. S., Su, L., Toescu, V., Hickman, R., Situnayake, D., Bowman, S., Farewell, V. and Gordon, C. (2015) 'Birmingham SLE cohort: outcomes of a large inception cohort followed for up to 21 years', *Rheumatology (Oxford)*, 54(5), pp. 836-43.
- Yildirim-Toruner, C. and Diamond, B. (2011) 'Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus', *J Allergy Clin Immunol*, 127(2), pp. 303-12; quiz 313-4.
- Yoshimi, R., Ueda, A., Ozato, K. and Ishigatsubo, Y. (2012) 'Clinical and pathological roles of Ro/SSA autoantibody system', *Clin Dev Immunol*, 2012, pp. 606195.

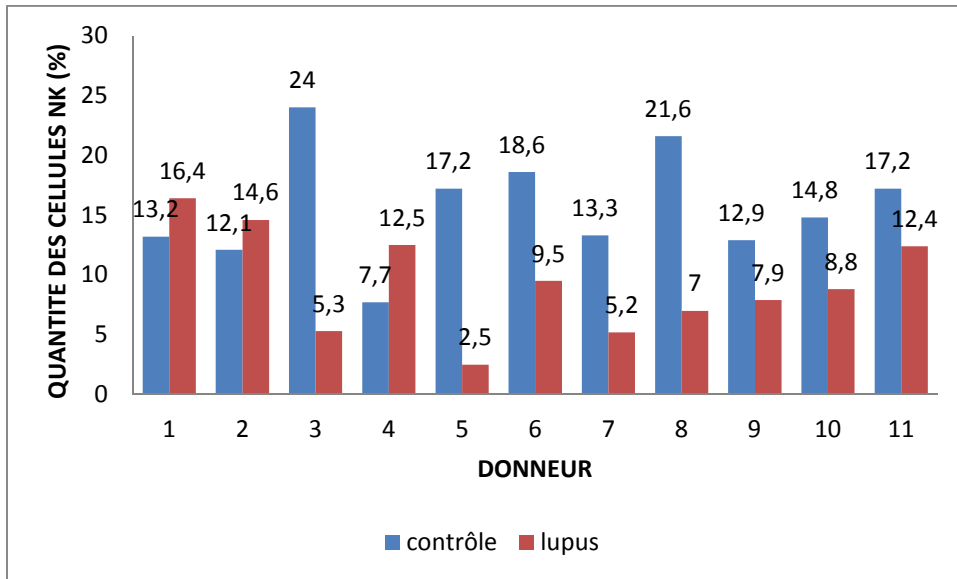
# Annexe

**Tableau I :** Les résultats obtenus de la quantification des cellules NK, LB et LT dans le sang périphérique qui a été réalisée sur 8 patients lupiques et 8 contrôles :

	NK CD56 <sup>+</sup> /CD3 <sup>-</sup> (%)	LB CD19(%)	LT CD3(%)
LUP 1	14,4	18,2	67,4
LUP 2	10,1	15,3	74,6
LUP 3	13,5	14,8	71,7
LUP 4	12,2	13,9	73,9
LUP 5	10,2	15,1	74,7
LUP 6	7,6	13	79,4
LUP 7	7,1	13,6	79,3
LUP 8	9,1	11,9	79
Contrôle 1	19,5	15,1	65,4
Contrôle 2	15,3	13,7	71
Contrôle 3	18,1	12,2	69,7
Contrôle 4	16,4	11,8	71,8
Contrôle 5	17,3	10,9	69,8
Contrôle 6	12,6	12,9	75,5
Contrôle 7	11,7	11,9	75,8
Contrôle 8	16,7	12,5	71,25

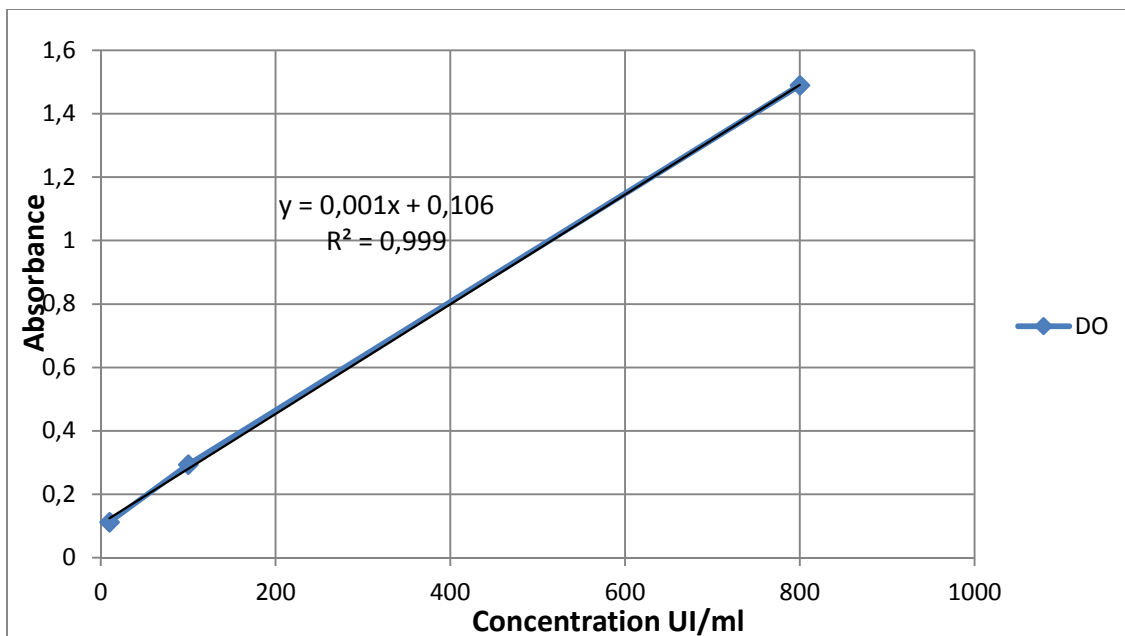
**Tableau II:** Quantité des cellules NK dans le sang des patients lupiques et des contrôles.

% NK contrôle	% NK lupus
13,2	16,4
12,1	14,6
24	5,3
7,7	12,5
17,2	2,5
18,6	9,5
13,3	5,2
21,6	7
12,9	7,9
14,8	8,8
17,2	12,4



**Figure 1 :** Histogramme représentatif des la variation de la quantité des cellules NK dans le sang des patients lupiques et les contrôles.

Les calibrateurs	1	2	3
La concentration (UI/ml)	800	100	10
DO (450 nm)	1.49	0.293	0.112



**Figure 2 :** Courbe de la gamme d'étalonnage réalisée à l'aide des calibrateurs pour le calcul des concentrations des Anti-ADNdb mesurées en UI/ml.