

Trousse pour la détection et la titration des anticorps antinucléaires et anticytoplasmiques dans le sérum humain par immunofluorescence indirecte.

ANA 120
ANA-240

Révision : Octobre 2007

Dénomination

ANA Orkit® est la marque déposée de Labodia pour une trousse de détection et de titration des anticorps antinucléaires et anticytoplasmiques dans le sérum humain par immunofluorescence indirecte.

Champ d'application

La présence d'anticorps antinucléaires circulants est souvent associée à une maladie systémique. Ces autoanticorps ont d'abord été décrits dans le lupus érythémateux disséminé (LED) (1,2), mais on les retrouve également dans la polyarthrite rhumatoïde, les sclérodermies, les connectivites mixtes, le syndrome de Gougerot-Sjögren, etc. (3). Plus récemment, d'autres autoanticorps, dirigés contre des constituants du cytoplasme, ont été associés à l'hépatite chronique active, à la polyarthrite rhumatoïde, au LED, etc. (4,5).

L'utilisation comme substrat des cellules épithéliales de la lignée HEp-2 constitue aujourd'hui la méthode de référence pour le dépistage des anticorps antinucléaires (6). Ce substrat est obtenu à partir de cellules cancéreuses humaines (lymphome de Burkitt) cultivées de manière à fournir un maximum de cellules en mitose, ce qui facilite l'identification de certaines images et la détection d'anticorps rares.

Principe de la méthode

ANA Orkit® est un test basé sur le principe de l'immunofluorescence indirecte et utilise comme substrat des cellules HEp-2 fixées sur des lames de verre. Un procédé de fixation spécial évite la dénaturation de certains antigènes fragiles (SS-A et Scl-70). La lignée choisie pour cette trousse présente trois caractéristiques essentielles :

- un rapport noyau/cytoplasme élevé de manière à faciliter l'identification des aspects nucléaires,
- un cytosquelette bien développé pour permettre la détection aisée des anticorps anti-actine, anti-tropomyosine et anti-cytokératine,
- un nombre suffisant de figures mitotiques afin de permettre la différenciation entre fluorescence périphérique et membranaire ou entre aspects homogènes et mouchetés; les cellules mitotiques sont également indispensables pour identifier les anticorps anti-centromère, anti-MSA-1, anti-MSA-2 et anti-MSA-3.

La procédure commence par une dilution des sérums à analyser. Les échantillons dilués sont ensuite incubés avec les cellules HEp-2; les anticorps antinucléaires ou anticytoplasmiques éventuellement présents se fixent sur des composants des noyaux ou sur d'autres constituants du substrat pour former des complexes antigène-anticorps. Après une étape de lavage, on ajoute des immunoglobulines anti-humaines marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITFC). Si l'échantillon est positif, le réactif fluorescent se fixe à son tour aux complexes antigène-anticorps lors d'une seconde incubation. Après élimination de l'excès de réactif par lavage, les lames sont contre-colorées au bleu d'Evans (en option). En cas de réaction positive, le noyau ou le cytoplasme apparaissent en vert brillant au microscope à fluorescence tandis qu'une réaction négative correspond à un champ vert-noir (sans contre-coloration) ou brun-vert (avec contre-coloration).

Composition de la trousse

ANA Orkit® : 120 puits, n° de catalogue ANA-120
240 puits, n° de catalogue ANA-240

Chaque trousse contient :

- 1 **[SLIDE]** Cellules HEp-2 (avec des stades mitotiques) cultivées directement sur les lames et stabilisées pour l'envoi à température ambiante (**[REF]** ANA110).
ANA-120 : 10 lames de 12 puits.
ANA-240 : 20 lames de 12 puits.
- 2 **[CONJ]** Conjugué ANA : 1 flacon compte-gouttes de 3,5 ml contenant des anticorps polyvalents de chèvre anti-IgG humaines (H+L) marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine et contenant la solution de bleu d'Evans. Prêt à l'emploi (**[REF]** ANP211).
Conservateur : 0,1% d'azide de sodium.
ANA-120 : 2 flacons
ANA-240 : 4 flacons
- 3 **[SAMPDIL]** Diluant des échantillons : 1 flacon de 120 ml contenant des agents anti-film et des protéines bloquantes en tampon PBS. Prêt à l'emploi (**[REF]** ANA500).
Conservateur : 0,1% d'azide de sodium
- 4 **[CTRL +]** Contrôle Positif Homogène 3/4+ : 1 flacon compte-gouttes de 0,5 ml contenant du sérum humain pré-dilué. Prêt à l'emploi (**[REF]** ANA301).
Ce sérum fournit une image homogène de forte intensité.
Conservateur : 0,1% azide de sodium.
- 5 **[CTRL NEG]** Contrôle Négatif : 1 flacon compte-gouttes de 0,5 ml contenant du sérum humain pré-dilué. Prêt à l'emploi (**[REF]** ANA400).
Ce sérum fournit une image typiquement négative.
Conservateur : 0,1% azide de sodium.
- 6 **[BUF]** Tampon ANA : PBS en poudre pour préparer un litre de tampon de lavage à pH 7.3 ± 0.2 (**[REF]** ANB100).
ANA-120 : 2 sachets.
ANA-240 : 4 sachets.
- 7 **[GLYC]** Solution de Montage : 1 flacon compte-gouttes de 3,5 ml contenant de la glycérine tamponnée. Prêt à l'emploi (**[REF]** ANM100).
- 8 Couvre-objets: lamelles de 24 x 60 mm, épaisseur No 1.
ANA-120 : 1 sachet de 10 couvre-objets.
ANA-240 : 2 sachets de 10 couvre-objets.

Matériel supplémentaire

- Tubes à usage unique et portoir.
- Micropipettes, 200-400 µl.
- Micropipettes de précision, 10 and 20 µl.
- Chambre humide (ou boîte de pétri contenant du papier absorbant humecté avec de l'eau désionisée).
- Deux cuvettes à coloration.
- Flacon d'un litre (tampon PBS).
- Microscope à fluorescence équipé d'un filtre d'excitation à 495 nm et d'un filtre d'arrêt à 515 nm.

Précautions et avertissements

- Pour usage diagnostique in vitro.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.
- Ne pas **remplacer** les réactifs de cette trousse par des produits équivalents. L'utilisation du **Conjugué**, du **Diluant des Echantillons** et de la **Solution de Montage** de la trousse est une condition indispensable à l'obtention de bons résultats.
- Éviter soigneusement toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons. **Le tampon PBS, une fois reconstitué, ne contient aucun agent conservateur.**
- Éviter de poser les doigts sur les puits lors de la manipulation des lames.

- Une fois la procédure entamée, **ne jamais laisser sécher les lames**. Le séchage des puits peut entraîner des faux négatifs, des images déformées ou de fausse fluorescence membranaires.
- Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium peut former des azides de plomb ou de cuivre dans la plomberie des laboratoires, entraînant des risques d'explosion. Pour éviter la formation de ces azides métalliques, rincer abondamment les canalisations après élimination des réactifs.

Avertissement : risque biologique

Certains réactifs de cette trousse contiennent du sérum humain. Ce sérum a été testé quant à l'absence d'anticorps anti-VIH et anti-hépatite C et d'antigène HBs par des trousse agréées. Néanmoins, comme il n'existe actuellement aucune méthode d'analyse permettant d'exclure totalement qu'un dérivé du sang humain soit capable de transmettre l'hépatite, le VIH ou toute autre infection virale, ces réactifs doivent être manipulés avec les précautions d'usage observées pour des échantillons présentant un risque biologique (voir ci-dessous).

Collecte et conservation des échantillons

- Cette trousse a été validée pour des échantillons de **sérum** humain. Ces réactifs peuvent toutefois être utilisés à des fins de recherche pour la détection des autoanticorps dans le liquide synovial ou dans d'autres liquides biologiques.
- Les échantillons peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C pendant 2 à 3 jours. Si le test ne peut être réalisé dans ce délai, les échantillons seront congelés à -20 °C et pourront être conservés 6 à 8 mois.
- L'utilisation d'échantillons **lipémiques** et **hémolysés** est à éviter car elle peut entraîner une baisse de titre ou des erreurs d'interprétation en cas de résultat positif. Toutefois, lorsqu'il est indispensable de tester des échantillons lipémiques ou hémolysés, on inactivera ces sérums par chauffage (30 minutes à 56 °C).
- Ne pas utiliser d'échantillons **contaminés**.
- Éviter autant que possible les cycles congélation/décongélation.
- Lorsque les échantillons sont expédiés à température ambiante, l'emploi d'un agent conservateur (Thimérosal à 0,01 % ou azide de sodium à 0.1 %) est conseillé.
- On a signalé des cas de faux positifs dus à une liaison du C1q à l'ADN cellulaire. Pour éviter ce type d'interférence, décomplémenter les échantillons par chauffage (30 minutes à 56 °C).

Préparation des réactifs et dilution des échantillons

Procéder aux étapes suivantes avant de commencer l'analyse.

1. Tampon PBS concentré

Dissoudre le tampon dans un litre d'eau déminéralisée. Remplir une pissette avec cette solution qui servira au rinçage des lames.

ATTENTION : le tampon PBS concentré ne contient aucun agent conservateur : conserver le tampon reconstitué à 2-8 °C pour un maximum de 8 mois. Éviter toute contamination microbienne lors de l'ouverture du flacon.

2. Dilution des échantillons

Diluer chaque échantillon à tester avec le Diluant dans des tubes à usage unique :

- **Dépistage** : diluer les échantillons 1:40 en ajoutant 10 µl de sérum à 390 µl de Diluant.
- **Titration** : pour les échantillons positifs, préparer des dilutions en série à partir de la dilution initiale selon le tableau suivant.

| Procédure de dilution | Titre final |
|--|-------------|
| 200 µl de la dilution initiale + 200 µl de Diluant | 1:80 |
| 200 µl de la dilution 1:80 + 200 µl de Diluant | 1:160 |
| 200 µl de la dilution 1:160 + 200 µl de Diluant | 1:320 |
| 200 µl de la dilution 1:320 + 200 µl de Diluant | 1:640 |
| 200 µl de la dilution 1:640 + 200 µl de Diluant | 1:1280 |
| 200 µl de la dilution 1:1280 + 200 µl de Diluant | 1:2560 |

Stockage et délai de validité des réactifs

Tous les réactifs de cette trousse sont stables jusqu'à la date de péremption (un an après la date de fabrication); les lames sont stabilisées pour permettre les expéditions à température ambiante. Conserver tous les réactifs à 2-8 °C. NE PAS CONGELER.

Mode opératoire

1. **Placer la trousse à température ambiante (20-25°C)** pendant 20 minutes.
NE PAS sortir les lames de leur emballage.
2. **Préparation des lames**
 - Sortir un nombre approprié de lames de leur emballage (en tenant compte des Contrôles Positifs, Négatif et du puits de contrôle réservé au Diluant) et les placer immédiatement dans une chambre humide.
 - Assigner 4 puits aux différents contrôles et marquer les lames.
3. **Dépôt des Contrôles et des échantillons**
 - Déposer **20 µl de Diluant** sur le puits de contrôle correspondant.
Déposer une goutte (20 µl) de Contrôle Négatif et de Contrôle Positif sur les puits correspondants : renverser le flacon compte-gouttes, presser délicatement le corps du flacon jusqu'à ce que la goutte soit bien visible puis déposer la goutte sur le puits en évitant tout contact direct entre le compte-gouttes et la surface de la lame.
 - Déposer **20 µl** de chaque échantillon **dilué** sur les puits correspondants.

ATTENTION :

 - Éviter tout contact direct entre les pointes de pipette et les lames.
 - Ne pas essayer de diluer (ou de titrer) les Contrôles Positifs.
4. Incuber les lames en chambre humide pendant **30 minutes à température ambiante (20-25°C)**.
5. **Laver les lames au PBS**
 - Laver les lames **une par une**.
 - Ne jamais laisser sécher les puits : les lames ne doivent pas rester hors de la chambre humide **plus de 15 secondes** avant d'être immergées dans le bac de lavage.
 - Ne jamais utiliser de l'eau distillée ou déminéralisée pour le lavage des lames.
 - **Retirer une lame de la chambre humide et l'incliner à 45°; à l'aide d'une pissette, arroser doucement de PBS la ligne médiane de la lame, de manière à rincer d'abord les puits 1 à 7, puis en modifiant l'inclinaison de la lame, les puits 8 à 14. Ne jamais diriger le jet de PBS directement sur les puits.**
 - Transférer **immédiatement** les lames rincées dans un bac de lavage rempli de PBS; temps d'immersion; **5-6 minutes**.
 - Agiter brièvement le bain une fois que toutes les lames y soient déposées. Répéter une fois le bain en changeant le PBS.

6. Dépôt du Conjugué Fluorescent

- Traiter les lames une par une.
- **Ne jamais laisser les lames sécher à l'air libre** : cette étape est l'une des plus critiques du mode opératoire et **ne doit pas prendre plus de 15 secondes** avant le retour de la lame en chambre humide.
- Retirer la lame de la cuve à coloration et absorber l'excès de tampon en la tapotant rapidement sur du papier absorbant; ne pas sécher la lame.
- Replacer **immédiatement** la lame dans la chambre et déposer une goutte de Conjugué Fluorescent sur chaque puits ou « inonder » les puits.

Remarques :

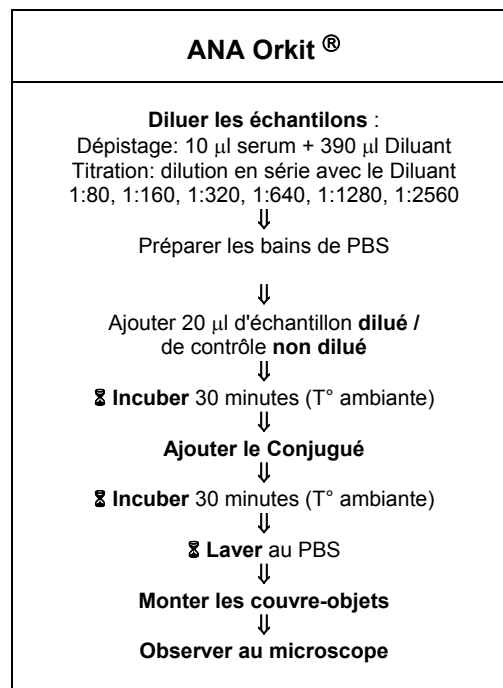
1. Cette technique consistant à inonder les puits plutôt que d'ajouter soigneusement une goutte de Conjugué par puits, n'entraîne pas de contamination entre puits; elle permet d'éviter les "effets de goutte", c'est-à-dire une concentration du Conjugué à la périphérie des puits, cause possible d'artefacts (images membranaires).
2. Si le Conjugué a été déposé en excès, retirer la lame de la chambre humide et essuyer rapidement les côtés de la lame pour éviter toute migration du Conjugué dans la chambre d'incubation.
7. **Incuber** les lames dans la chambre humide pendant **30 minutes à température ambiante** (20-25°C). Éviter toute exposition directe au soleil ou à la lumière d'une lampe halogène.
8. **Lavage au PBS** : répéter l'étape 5.
9. **Montage des couvre-objets**

- Placer un nombre approprié de lamelles couvre-objets sur un papier absorbant.
- Ajouter 2 à 3 gouttes de Solution de Montage au bas de chaque couvre-objet.
- Retirer les lames du bain une par une et éliminer l'excès de PBS. **NE PAS ESSUYER** les lames et **NE PAS LES LAISSER SECHER** à l'air, le couvre-objet doit être placé dans les **15 SECONDES** suivant la sortie du bain.
- Positionner le bas de la lame contre le bas du couvre-objet puis abaisser doucement la lame sur le couvre-objet en s'assurant que la Solution de Montage migre jusqu'en haut de la lame sans laisser de poches d'air.

NE PAS UTILISER un excès de Solution de Montage : ceci aurait pour effet de donner une image floue ou de créer une fluorescence parasite.

Observer les lames au microscope à fluorescence; un grossissement de 200 x permet de trier les positifs et les négatifs tandis qu'un grossissement de 400 x est conseillé pour l'identification et la titration

Lorsque les lames révélées ne peuvent être examinées immédiatement, les conserver dans une chambre humide enveloppée d'une feuille d'aluminium et placée à 2-8 °C. Pour des périodes de conservation plus longues (jusqu'à 6 mois), ajouter un agent conservant la fluorescence à la Solution de Montage.



Résultats

1. Résultat positif ou négatif

- Un échantillon est considéré comme **négatif** lorsque l'intensité de la fluorescence est proche de celle obtenue avec le Contrôle Négatif et lorsqu'il n'y a aucune image caractéristique dans le noyau ou le cytoplasme.
- Un échantillon est considéré comme **positif** lorsque l'intensité de la fluorescence est supérieure à celle obtenue avec le Contrôle Positif et lorsqu'on peut identifier un aspect caractéristique dans le noyau ou le cytoplasme.

2. Rendu des résultats

Les résultats positifs sont rendus avec leur titre et/ou l'intensité de la fluorescence, et la description de l'image.

• Titre

Le titre rendu se rapporte à la dilution la plus élevée à laquelle on peut clairement reconnaître une image.

Les échantillons présentant une forte fluorescence à la dilution 1:2560 ont un titre "supérieur à 1:2560".

Les titres 1:40 et 1:80 sont considérés comme faibles, 1:160 et 1:320, comme significatifs et les titres supérieurs ou égaux à 1:640 comme élevés.

• Intensité de la fluorescence

L'intensité de la fluorescence peut être semi-quantifiée selon une échelle établie par le "Center for Disease Control" (CDC) d'Atlanta, en Géorgie (USA).

4+ : fluorescence jaune-vert brillant d'intensité maximale; cellules bien visibles avec un noyau nettement marqué.

3+ : fluorescence jaune-vert moins brillante; cellules bien visibles avec un noyau nettement marqué

2+ : image caractéristique mais fluorescence assez faible; les contours des cellules sont moins bien définis.

1+ : faible fluorescence; les noyaux sont généralement peu distincts du reste des cellules.

Images nucléaires

1. Images homogènes

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Homogène : fluorescence marquant uniformément le noyau et recouvrant ou non les nucléoles; la région chromosomique des cellules en mitose est nettement marquée.</p> <p>ATTENTION : une image homogène résulte souvent de la superposition de plusieurs images ou masque une autre image; diluer systématiquement les échantillons homogènes.</p> <p>Les cellules en mitose permettent de différencier entre une image homogène et une image finement mouchetée : lorsque l'image est exclusivement mouchetée, les cellules en mitose présentent une fluorescence mouchetée couvrant soit la totalité de la cellule, soit la cellule moins la région chromosomique. Lorsque la région chromosomique est marquée, on est en présence de deux ou de plusieurs anticorps qui devront être titrés séparément.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-nADN anti-dsADN, anti-ssADN, anti-DNP* ◆ anti-histones (H1, H2 A, H2 B, H3, H4). ◆ reconnaissant d'autres antigènes de la chromatine (prolamines, protamines, etc). <p>*DNP = complexes ADN-histones</p> |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ LED (anti-ADN, anti-histones lorsque <i>les titres sont élevés</i>) ◆ lupus médicamenteux (anti-histones) ◆ polyarthrite rhumatoïde (anti-histones) |
| Examens complémentaires | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-nADN par ELISA ◆ anti-histones par ELISA <p>Remarque : les examens complémentaires sont indispensables car de nombreux antigènes autres que l'ADN et les histones peuvent produire une image homogène; toutefois, grâce aux cellules en mitose, les cellules HEP-2 constituent un bon test d'orientation : les anticorps anti-ADN et anti-histones induisent une fluorescence de la région chromosomique à tous les stades de la mitose alors que pour d'autres anticorps, la fluorescence n'est visible que dans la méta- et la prométaphase.</p> |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Homogène-périphérique : la fluorescence est particulièrement intense à la périphérie du noyau avec un large anneau lumineux correspondant à la membrane nucléaire interne; le reste du noyau présente une fluorescence uniforme, mais de moindre intensité. Les cellules en mitose sont fortement marquées avec un aspect similaire.</p> <p>ATTENTION : utiliser les cellules en mitose pour différencier une image périphérique d'une image membranaire : dans le cas d'une image membranaire, on n'observe pas (ou peu) de fluorescence dans les cellules en mitose, seule exception, une fluorescence de la ⇒ périchromine (rare) entraîne une intense réaction des cellules en mitose localisée exclusivement autour de la région chromosomique.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-nADN anti-dsADN ◆ anti-histones (H1, H2 A, H2 B, H3, H4) ◆ reconnaissant d'autres antigènes de la chromatine. <p>Remarque : les anti-histones sont très rarement associés à une image périphérique.</p> |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ LED (anti-ADN, anti-histones) ◆ lupus médicamenteux (anti-histones) |
| Examens complémentaires | <ul style="list-style-type: none"> ◆ => voir images homogènes |

2. Images membranaires

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | <p>Anti-lamine : fluorescence homogène de la membrane nucléaire (fluorescence annulaire); la région chromosomique des cellules en mitose n'est pas marquée, sauf à la fin de la télophase où les deux noyaux sont entourés d'une fine ligne fluorescente.</p> <p>∞ : parfois associée à une image homogène.</p> <p>NE PAS CONFONDRE avec une image périphérique (utiliser les cellules en mitose).</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-lamines A, B and C (protéines fibrillaires de la membrane nucléaire). |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ LED, sclérodémie linéaire, polyarthrite rhumatoïde. ◆ association hépatite chronique - thrombopénie et/ou anémie hémolytique cortico-sensible. |

Note : ∞ = association d'images

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | Annulaire associé une fluorescence cytoplasmique mouchetée : le noyau est entouré d'un anneau fluorescent, la région chromosomique des cellules en mitose n'est pas marquée et le cytoplasme contient des grains fluorescents de taille variable correspondant à un marquage des mitochondries. |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ dirigés contre une protéine (200 kD) de la membrane nucléaire de 200 kDa. ◆ anti-M2, anti-M3 et anti-M6 (⇒ voir images mitochondriales à la section images cytoplasmiques). |
| Associations cliniques | ◆ ⇒ voir images mitochondriales |
| Examens complémentaires | ◆ confirmer la présence d'anticorps d'anti-mitochondries sur rein de rat ou par un test ELISA spécifique des anti-M2. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | Pores nucléaires : fluorescence annulaire ponctuée ; fins granules fluorescents dans le nucléoplasme; la région chromosomique des cellules en mitose n'est pas marquée mais elle est entourée d'une zone d'intense fluorescence homogène. |
| Anticorps | ◆ dirigés contre des protéines du complexe des pores nucléaires. |
| Associations cliniques | ◆ polymyosites. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | Périchromine : intense fluorescence annulaire; cellules en mitose : forte fluorescence entourant la région chromosomique. |
| Anticorps | Dirigés contre la périchromine (protéine membranaire). |
| Associations cliniques | ◆ LED |

3. Images mouchetées

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | <p>hnRNP* : gros grains fluorescents couvrant la totalité du nucléoplasme et reliés entre eux par un réseau de filaments fluorescents; la région chromosomique des cellules en mitose n'est pas marquée.</p> <p>☉ : Observation rare en tant qu'image isolée, le plus souvent associée à une image de type Sm/RNP.</p> <p><i>* hnRNP = ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes.</i></p> |
| Anticorps | ◆ dirigés contre différents constituants de la matrice nucléaire |
| Associations cliniques | ◆ connectivites mixtes |
| Examens complémentaires | ◆ rechercher les anti-Sm / RNP par ELISA. |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Sm/nRNP : granules irréguliers couvrant la totalité du nucléoplasme, la région chromosomique des cellules en mitose n'est pas marquée.</p> <p>☉ : souvent associée à une image hnRNP, parfois avec une image nucléolaire.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-nRNP (ribonucléoprotéine nucléaire = U1 RNP). ◆ anti-Sm (Complexe U1, U2, U4, U5 RNP). |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ LED(Sm). ◆ connectivites mixtes (Sm). ◆ syndrome de Gougerot-Sjögren, sclérodémie polyarthrite rhumatoïde, LED, lupus discoïde induit par la procaïnamide (RNP). |
| Examens complémentaires | ◆ confirmer par ELISA, par contre-immunoelectrophorèse, etc. |

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | <p>SL/Mi : fines granulations de faible intensité couvrant le noyau; à ne pas confondre avec une image de type SS-A; la région chromosomique des cellules en mitose n'est pas marquée.</p> <p>☉ : souvent associée à une image de type PCNA, parfois à des images nucléolaires.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-Mi (Mi1 and Mi2). ◆ anti-SL (synonyme de "anti-Ki" ou de "anti-Ku"). |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ LED. ◆ dermatomyosite. |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>SS-B : moucheté : fluorescence intense et granulaire donnant au nucléoplasme l'aspect d'une vitre couverte de givre; la fluorescence couvre l'ensemble du nucléoplasme et s'étend parfois aux nucléoles avec quelques grains isolés dans le cytoplasme (assez courant); la région chromosomique des cellules en mitose est faiblement marquée ou pas du tout.</p> <p>⊙ : souvent associée à une image de type SS-A.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-SS-B (La, Ha) |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ syndrome de Gougerot-Sjögren ◆ LED ◆ hépatite chronique active |
| Examens complémentaires | <ul style="list-style-type: none"> ◆ confirmer par ELISA. |

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | <p>SS-A : fines granulations recouvrent la totalité du noyau; la région chromosomique des cellules en mitose n'est pas marquée</p> <p>⊙ : souvent associée à des images de type SS-B.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-SS-A (Ro) |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ syndrome de Gougerot-Sjögren ◆ LED, lupus néonatal, bloc cardiaque congénital ◆ autres maladies systémiques |
| Examens complémentaires | <ul style="list-style-type: none"> ◆ confirmer par ELISA. |

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | <p>PCNA : fluorescence mouchetée très irrégulière, allant de l'absence totale de réaction dans certaines cellules à la présence de fines ou de larges granulations dans d'autres (pléomorphisme); contrôler l'absence de fluorescence dans la région chromosomique des cellules en mitoses.</p> <p>Cette image est rare mais facile à confondre avec un autre marquage pléomorphe où le cytoplasme de certaines cellules contient également des granules fluorescents. Cette image constitue un faux positif et résulte d'une réaction polyclonale dirigée contre les sites de <i>synthèse protéique</i> après une infection.</p> <p>⇒ voir également les images de type MSA-2 et MSA-3, pour éviter toute <i>confusion avec</i> une image caractéristique des cellules en mitose.</p> <p>⊙ : les images de type PCNA sont parfois associées à des images homogènes.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-PCNA ("proliferating cell nuclear antigen" = cycline). |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ LED ◆ Lymphomes |
| Examens complémentaires | <ul style="list-style-type: none"> ◆ confirmer par immunodiffusion ou par contre-immunoelectrophorèse. ◆ recherche des anti-DNA par ELISA en cas d'association à une image homogène. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Centromère : 23 ou 46 (ou multiples de 46) grains brillants, ovoïdes, répartis dans le noyau des cellules en interphase; dans les cellules en mitose, ces granules sont regroupés dans la région chromosomique.</p> <p>⊙ : parfois associée à des images nucléolaires homogènes.</p> |
| Anticorps | <ul style="list-style-type: none"> ◆ anti-centromère (kinétochore); en fait, ces anticorps sont dirigés contre plusieurs protéines distinctes du centromère. |
| Associations cliniques | <ul style="list-style-type: none"> ◆ CREST (Calcinose, Raynaud, Oesophage, Sclérodactylie, Téliangiectasie) ◆ sclérodermie ◆ cirrhose biliaire primitive |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Nucléaire ponctuée ("NSP1 nuclear speckled type 1") : grains de taille relativement uniforme limités au nucléoplasme; la région chromosomique des cellules en mitose n'est jamais marquée.</p> <p>ATTENTION : ne pas confondre avec une image de type centromère : vérifier le nombre de grains fluorescents : 2 - 4 grains : "nuclear dots" 5 - 10 grains : "multiple dots". ☉ : souvent associée à des images de type actine ou mitochondrial.</p> |
| Anticorps | <p>◆ dirigés contre des protéines nucléaires partiellement caractérisées (32, 80 et 100 kDa)</p> |
| Associations cliniques | <p>◆ cirrhose biliaire primitive (signe d'alerte) ◆ hépatite chronique active</p> <p>Note : une association NSP1 + actine suggère une hépatite chronique active tandis que l'association NSP1 + mitochondries est davantage caractéristique d'une cirrhose biliaire primitive.</p> |
| Examens complémentaires | <p>◆ tester régulièrement la fonction hépatique chez les sujets avec test HBsAg positif. ◆ ⇒ voir également images de type actine ou mitochondrial.</p> |

Images nucléolaires

Les images nucléolaires sont le plus souvent associées à des images **nucléaires**.

ATTENTION : les images nucléolaires constituent la cause la plus fréquente des **faux positifs** observés avec des cellules HEp-2. Ces faux positifs sont généralement dus à :

- une contre-coloration excessive : ce problème peut être facilement évité en réduisant la concentration de bleu d'Evans ou en travaillant sans contre-coloration.
- une détérioration des lames provoquée par la chaleur, dans ce cas, on observe une fluorescence nucléolaire dans le puits de contrôle préparé avec le Diluant; l'image obtenue avec le Contrôle Homogène sera également anormale.
- une verrerie mal nettoyée ou à la mauvaise qualité de l'eau utilisée pour préparer le tampon PBS, ce type d'interférence est facilement repérable avec un puits de contrôle préparé avec le Diluant.

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Nucléolaire homogène : tous les nucléoles sont uniformément fluorescents et le nucléoplasme est couvert de fines granulations fluorescentes.</p> <p>☉ : parfois associé à une image de type centromère.</p> |
| Anticorps | <p>◆ anti PM/Scl (polymyosite/sclérodémie) = en fait dirigé contre la nucléoline et d'autre constituants nucléolaires (PM-1, PL-6, etc.)</p> |
| Associations cliniques | <p>◆ polymyosite/sclérodémie ◆ sclérodémie, surtout avec complications rénales.</p> |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Nucléolaire granulaire : grappes serrées de granules fluorescents dans les nucléoles.</p> <p>☉ : parfois en association avec une image de type nucléaire ponctué ("NSP1 dots").</p> |
| Anticorps | <p>◆ anti-fibrillarine (7-2-ARN). ◆ anti-U3NP (ribonucléoprotéine).</p> |
| Associations cliniques | <p>◆ sclérodémie; ces anticorps se rencontrent surtout chez des hommes jeunes.</p> |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | <p>Nucléolaire mouchetée : granulations fines et isolées dans le nucléole (risque de confusion avec une image homogène) agencées sur un réseau filamenteux circonscrit au nucléole; souvent accompagnée d'une fluorescence mouchetée très dense dans le nucléoplasme; on notera la zone sombre séparant le nucléole du nucléoplasme.</p> |
| Anticorps | <p>◆ anti-Scl 70 (anti-topoisomérase I).</p> |
| Associations cliniques | <p>◆ sclérodémie</p> |
| Examens complémentaires | <p>◆ recherche des anti-Scl-70 par ELISA.</p> |

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | <p>Ponctuations nucléolaires : quelques granules fluorescents de taille irrégulière dans les nucléoles des cellules en interphase; paires de grains fluorescents dans la plaque métaphasique des cellules en mitose (image rare).</p> |
| Anticorps | <p>◆ anti-NOR 90 ("Nucleolar Organizing Region" = organisateur nucléaire).</p> |
| Associations cliniques | <p>◆ sclérodémie.</p> |

Images propres aux cellules en mitose

Quelques anticorps reconnaissent exclusivement des composants du fuseau mitotique et ne peuvent être observés que sur les cellules en mitose. En général, ces anticorps ne sont pas associés à des maladies auto-immunes et correspondent à des images **faussement positives**.

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | NSP II (Nuclear speckled II) : larges grains fluorescents de taille variable concentrés autour de la région chromosomique des cellules en métaphase (rare). |
| Anticorps | ◆ non caractérisés. |
| Associations cliniques | ◆ inconnues. |

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | Centrioles : les pôles du fuseau sont fluorescents; dans les cellules en interphase, la fluorescence est limitée à une petite sphère proche du noyau. |
| Anticorps | ◆ non caractérisés. |
| Associations cliniques | ◆ cette image est un faux positif fréquent et s'observe après une infection virale (CMV, Epstein-Barr). |

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | Polaire ou NuMA ("Nuclear Mitotic associated protein") ou MSA-1 (Mitotic Spindle Apparatus type 1) : fluorescence triangulaire recouvrant la partie supérieure du fuseau. |
| Anticorps | ◆ dirigés contre une protéine de haut PM du fuseau. |
| Associations cliniques | ◆ faux positif accompagnant des états inflammatoires (arthrite). |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | MSA-2 ("Mitotic Spindle Apparatus type 2") : cette image est facilement interprétée à tort comme une image de type PCNA , avec de fines granulations couvrant les noyaux des cellules en interphase; rechercher les cellules en télophase qui présentent une forte fluorescence à la jonction cellulaire. |
| Anticorps | ◆ dirigés contre un précurseur protéique d'un constituant fibrillaire de la membrane nucléaire. |
| Associations cliniques | ◆ sclérodémie (rare). ◆ faux positif : observé lors d'états inflammatoires. |
| Examens complémentaires | ◆ rechercher des marqueurs plus spécifiques des scléroses par contre-immunoelectrophorèse, ELISA, etc. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | MSA-3 ("Mitotic Spindle Apparatus type 3") : - interphase : aspect de type PCNA , - prophase : petits grains fluorescents entourant le noyau, - métaphase : deux rangées de grains fluorescents de part et d'autre de la plaque, - télophase : pas de réaction. |
| Anticorps | ◆ non caractérisés |
| Associations cliniques | ◆ faux positif : carcinomes de l'appareil respiratoire. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | Tubuline : marquage des fibres, surtout au niveau des pôles; une fluorescence cytoplasmique est visible dans les cellules en interphase. ◆ ⇒ voir aussi les images de type tubuline au chapitre des images cytoplasmiques. |
| Anticorps | ◆ anti-tubuline. |
| Associations cliniques | ◆ ⇒ voir tubuline , images cytoplasmiques. |

Images cytoplasmiques

De nombreux autoanticorps dirigés contre des constituants du cytoplasme peuvent être détectés sur cellules HEP-2. Ces anticorps peuvent s'observer seuls ou en association avec des anticorps antinucléaires. Les images positives nécessitent également des examens complémentaires et ne sont pas toujours associées à des maladies systémiques.


| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | Mitochondriale : gros granules de forme irrégulière, concentrés dans la région périnucléaire, également présents dans le reste du cytoplasme, mais en moins grande quantité. <i>ATTENTION</i> : ne pas confondre avec une image \Rightarrow nucléaire membranaire . ⊗ : parfois associée à une image de type NSP1 . |
| Anticorps | ◆ anti-M2, anti-M3 et anti-M6. (les anti-M1 et les anti-M5 ne sont pas décelables sur cellules HEP-2). |
| Associations cliniques | ◆ cirrhose biliaire primitive (anti-M2). ◆ lupus médicamenteux induit (anti-M3 et anti-M6). ◆ hépatite chronique active. ◆ sclérodermie. ◆ syndrome de Reynold. ◆ syndrome de Gougerot-Sjögren. ◆ polyarthrite rhumatoïde. |
| Examens complémentaires | ◆ confirmation sur rein de rat, rechercher des anti-M2 par ELISA. |

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | Fines granulations couvrant l'ensemble du cytoplasme. |
| Anticorps | ◆ dirigés contre diverses protéines dont un constituant de la particule de reconnaissance (SRP = "signal recognition particle"). |
| Associations cliniques | ◆ myosite. |

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | Périnucléaire : fines granulations, généralement de faible intensité, entourant le noyau. |
| Anticorps | ◆ anti-Jo1 (ou anti-PL1). ◆ anti-PL7 (rare). ◆ anti-PL12 (rare). ◆ anti-KJ |
| Associations cliniques | ◆ polymyosite, principalement avec fibrose pulmonaire interstitielle diffuse. ◆ dermatomyosite (rare) |
| Examens complémentaires | ◆ recherche des anti-Jo1 par ELISA ou par d'autres tests spécifiques. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | Périnucléaire de type réticulum endoplasmique : les granulations sont de taille moyenne et concentrées à un pôle du noyau. |
| Anticorps | ◆ mal définis, dirigés contre des constituants du réticulum endoplasmique. |
| Associations cliniques | ◆ mal définies. |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | Ribosomale : fines granulations très denses couvrant tout le cytoplasme; aspect observable dans le LCR. ⊗ : souvent associée à une image nucléaire . |
| Anticorps | ◆ dirigés contre des protéines ribosomiques. |
| Associations cliniques | ◆ LED, surtout avec des complications neurologiques. ◆ polyarthrite rhumatoïde. ◆ syndrome de Sharp. |
| Examens complémentaires | ◆ recherche des facteurs rhumatoïdes. ◆ recherche des anti-ADN natifs par ELISA. |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | Actine : filaments ressemblant à des câbles traversant les cellules pour leur donner un aspect de "toile d'araignée".  : parfois associée à une image mitochondriale ou NSP1 . |
| Anticorps | ◆ anti-actine (anti-muscle lisse). |
| Associations cliniques | ◆ hépatite chronique active. ◆ cirrhose biliaire primitive. NOTE : seuls des titres élevés sont significatifs; des titres faibles sont fréquents après une infection virale (Epstein-Barr). |
| Examens complémentaires | ◆ confirmation sur estomac de rat ◆ ⇒ voir également sous fluorescence mitochondriale . |

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | Tropomyosine : filaments courts hérissant le bord des cellules. |
| Anticorps | ◆ anti-tropomyosine. |
| Associations cliniques | ◆ hépatite chronique active en phase aiguë. |
| Examens complémentaires | ◆ tests de la fonction hépatique. |

| | |
|--------------------------------|---|
| Fluorescence | Tubuline : petites fibres très denses, mais floues recouvrant tout le cytoplasme; cellules mitotiques : les fibres marquées sont surtout présentes vers les pôles. |
| Anticorps | ◆ anti-tubuline |
| Associations cliniques | ◆ cirrhose alcoolique. ◆ thyroïdite de Hashimoto. ◆ sclérodermie. ◆ CREST. ◆ phénomène de Raynaud |
| Examens complémentaires | ◆ anticorps antithyroïdiens par ELISA ◆ exploration fonctionnelle de la thyroïde. |

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | Cytokératine : fluorescence radiale en "nid d'abeille"; également présente dans le liquide synovial |
| Anticorps | ◆ anti-cytokératine |
| Associations cliniques | ◆ polyarthrite rhumatoïde. ◆ sclérodermie. ◆ LED. |
| Examens complémentaires | ◆ Confirmation sur œsophage de rat. ◆ recherche des facteurs rhumatoïdes. |

| | |
|--------------------------------|--|
| Fluorescence | Vimentine : filaments bouclés principalement localisés autour du noyau; image fréquente, mais peu spécifique. |
| Anticorps | ◆ anti-vimentine |
| Associations cliniques | ◆ polyarthrite rhumatoïde. ◆ LED. ◆ sclérodermie. ◆ métastases osseuses. ◆ aspect également rencontré chez des sujets normaux. |
| Examens complémentaires | ◆ recherche des facteurs rhumatoïdes lorsqu'il n'y a pas association à une autre image. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | Vinculine : épines fluorescentes partant de la membrane cytoplasmique et pointant vers le noyau. |
| Anticorps | ◆ anti-vinculine. |
| Associations cliniques | ◆ inconnues. |

| | |
|-------------------------------|---|
| Fluorescence | Appareil de Golgi : fines mouchetures fluorescentes et lamelles fluorescentes superposées à un pôle du noyau (rare). |
| Anticorps | ◆ dirigés contre les dictyosomes de l'appareil de Golgi. |
| Associations cliniques | ◆ syndrome de Gougerot-Sjögren. ◆ LED. ◆ sclérose en plaques : les anticorps sont présents dans le LCR. |

| | |
|-------------------------------|--|
| Fluorescence | Lysosomes : vacuoles fluorescentes de taille variable éparpillées dans tout le cytoplasme (rare). |
| Anticorps | ◆ contre des constituants lysosmiques non définis. |
| Associations cliniques | ◆ LED. |

Valeurs normales

- Un résultat négatif, tant pour les anticorps antinucléaires que pour les anticorps anticytoplasmiques, est en principe obtenu chez les sujets normaux de moins de 60 ans; toutefois, on observe des résultats positifs, à des titres faibles, chez 2 à 3 % des individus ne présentant aucun signe de pathologie autoimmune.
- Au-delà de 60 ans, le pourcentage de ces résultats faiblement positifs passe à 12 - 15 %. Très souvent, les images obtenues ne peuvent être caractérisées qu'à la dilution 1:40 et leur signification clinique reste incertaine. Certains laboratoires préfèrent ignorer ces observations et ne rendent des résultats positifs qu'à partir de la dilution 1:80.
- Des résultats positifs peuvent être observés chez des individus apparemment en bonne santé, mais généralement à des titres faibles. Entre 20 et 60 ans, ces observations touchent 7 % des femmes pour 3 % des hommes. Après 80 ans, la fréquence de ces résultats passe à 50 % dans les deux sexes.
- Des résultats positifs sont parfois obtenus en l'absence de toute maladie autoimmune après une infection ou chez des patients cancéreux.
- Les images positives changent fréquemment d'aspect lors de la titration des échantillons. Ce phénomène est dû à la présence simultanée de plusieurs anticorps, les anticorps présents aux titres les plus faibles disparaissant au fur et à mesure des dilutions.

Contrôle de qualité

- Introduire les Contrôles Positifs, le Contrôle Négatif et le Diluant dans chaque série de manière à vérifier la reproductibilité, la spécificité et la sensibilité de l'analyse
- Le **Contrôle Positif 4+** doit fournir une intense fluorescence homogène du noyau, de teinte vert-jaune brillant, et un marquage net de la région chromosomique des cellules en mitose
- Le **Contrôle Négatif** doit fournir un faible marquage fluorescent des noyaux sans qu'il soit possible de caractériser l'image obtenue.
- Le diluant sert à déceler les fluorescences non spécifiques : ce puits devrait être exempt de toute fluorescence verte.
ATTENTION : les Contrôles Positif et Négatif de la **trousse servent uniquement** à tester l'intégrité des réactifs et le bon déroulement de l'analyse; ils ne constituent en aucun cas des exemples d'aspects obtenus avec des échantillons positifs ou négatifs.

Limites

- Un résultat positif suggère certaines associations cliniques, mais ne constitue pas un critère de diagnostic; il devra être confirmé par d'autres examens de laboratoire et par la clinique.
- De nombreux médicaments sont capables d'induire la formation d'autoanticorps. Ces phénomènes peuvent être dus au mécanisme d'action de ces substances (hydralazine, procaïnamide, phénytoïne, carbamazépine, isoniazide, chlorpromazine) ou à une réaction allergique (acide p-aminosalicylique, D-pénicillamine, lévodopa, phénylbutazone, contraceptifs oraux, quinidine, etc.). Ces anticorps iatrogènes sont généralement des anti-histones et entraînent un aspect nucléaire homogène ou homogène/périphérique.

Références

1. Friou G. J. *Clinical Application of Lupus Serum - Nucleoprotein Reaction Using the Fluorescent Antibody Technique*. *J. Clin Invest* 36:890 (1957).
2. Holman H. R.; Kunkel H. G. *Affinity between the lupus ... Science* 126:162-163 (1957).
3. Fritzler M. J. *Autoantibody Testing : Procedures and Significance in Systemic Rheumatic Diseases*. *Meth. Achiev. exp. Pathol.* 12:224-260 (1986).
4. Fritzler M. J. and Salazar M. *Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies*. *Clinical Microbiology Reviews*, 4:256-269 (1991).
5. Tan E.M. *Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA) : Their Immunobiology and Medicine*. *Adv. Immunol* 33:167-240 (1982).
6. McCarty G.A., Rice J. R., *Characterization and Comparison of commercially available antinuclear antibody kits using single pattern index sera*. *J. Rheum.* 7:339-347 (1980).



LABODIA S.A

Chanta-Merloz 26
P.O. Box 48
CH-1169 Yens
Switzerland
☎ + 41 (0) 21 800 34 84
✉ + 41 (0) 21 800 34 49
e-mail: info@labodia.com
Web site: www.labodia.com



| | |
|---|----|
| Images nucléaires | |
| ● homogènes | |
| ▫ homogènes ⇔ <i>ADN, histones</i> | 4 |
| ▫ homogènes /périphérique ⇔ <i>ADN, histones</i> | 4 |
| ● membranaires | |
| ▫ annulaire fine ⇔ <i>lamines</i> | 4 |
| ▫ annulaire (avec fluorescence cytoplasmique mouchetée) | 5 |
| ▫ annulaire ponctuée ⇔ <i>pores nucléaires</i> | 5 |
| ▫ annulaire intense ⇔ <i>périchromine</i> | 5 |
| ● mouchetées | |
| ▫ gros granules reliés entre eux par un réseau fluorescent ⇔ <i>hn RNP</i> | 5 |
| ▫ granulation moyenne ⇔ <i>Sm/nRNP</i> | 5 |
| ▫ granulation fine et régulière ⇔ <i>SL/Mi</i> | 5 |
| ▫ granulation très dense "vitrée givrée" ⇔ <i>SS-B</i> | 6 |
| ▫ granulation fine en tête d'épingle ⇔ <i>SS-A</i> | 6 |
| ▫ granulation variable selon les cellules ⇔ <i>PCNA</i> | 6 |
| ▫ 23 ou 46 grains ⇔ <i>centromère</i> | 6 |
| ▫ 2 - 4 grains / NSP1 - "nuclear dots" | 7 |
| ▫ 5 - 10 grains / NSP1 - "multiple dots" | 7 |
| Images nucléolaires | |
| ▫ homogène ⇔ <i>PM/ScI</i> | 7 |
| ▫ granulaire ⇔ <i>fibrillarine</i> | 7 |
| ▫ mouchetée ⇔ <i>ScI-70</i> | 7 |
| ▫ ponctuée ⇔ <i>NOR 90</i> | 7 |
| Images cytoplasmiques | |
| ● mouchetée | |
| ▫ gros grains ⇔ <i>mitochondries</i> | 9 |
| ▫ grains fins ⇔ <i>SRP</i> | 9 |
| ▫ périnucléaire ⇔ <i>Jo1</i> | 9 |
| ▫ périnucléaire ⇔ <i>réticulum endoplasmique</i> | 9 |
| ▫ grains fins et denses ⇔ <i>ribosomes</i> | 9 |
| ● filamenteuses | |
| ▫ toile d'araignée ⇔ <i>actine</i> | 10 |
| ▫ fibres courtes à la périphérie des cellules ⇔ <i>tropomyosine</i> | 10 |
| ▫ fibres floues avec pôles fluorescents dans les cellules en mitose ⇔ <i>tubuline</i> | 10 |
| ▫ nid d'abeilles ⇔ <i>cytokératine</i> | 10 |
| ▫ boucles périnucléaires ⇔ <i>vimentine</i> | 10 |
| ▫ épines à la périphérie des cellules ⇔ <i>vinculine</i> | 10 |
| ● organites (rares) | |
| ▫ lamelles à un pôle du noyau ⇔ appareil de <i>Golgi</i> | 11 |
| ▫ vacuoles ⇔ <i>lysosomes</i> | 11 |
| Images des cellules en mitose | |
| ▫ métaphase : larges granulations entourant les chromosomes/NSP II | 8 |
| ▫ centrioles | 8 |
| ▫ fluorescence polaire triangulaire / NuMA (<i>MSA-1</i>) | 8 |
| ▫ télophase : fluorescence à la jonction des cellules ("faux PCNA") / <i>MSA-2</i> | 8 |
| ▫ métaphase : 2 rangées de granules de part et d'autre de la plaque / <i>MSA-3</i> | 8 |
| ▫ fibres et fuseau ⇔ <i>tubuline</i> | 8 |

