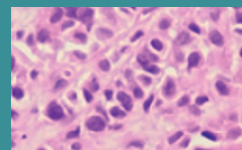
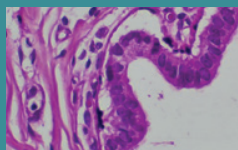
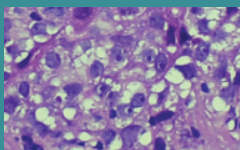


Mariame CHRAÏBI



Manuel technique d'Anatomie et Cytologie Pathologique



www.chutanger.ma

Manuel technique d'Anatomie et Cytologie Pathologique

Mariame CHRAÏBI

Professeure en Anatomie et Cytologie Pathologique
Chef de service du laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique
Centre Hospitalier Universitaire Tanger Tétouan AL Hoceima
Faculté de Médecine et de pharmacie de Tanger

Remerciements

Nous tenons à remercier à travers ce Manuel technique, la Direction du CHU Tanger-Tétouan-Al Hoceima (TTA) et tout particulièrement notre Directeur Pr Harif, pour ses encouragements, son soutien, son dynamisme exceptionnel, surtout pour avoir accepté de préfacer ce Manuel et participer à son enrichissement par ses remarques pertinentes.

Nos vifs remerciements à Pr Ahallat, Doyen de la Faculté de Médecine de Tanger, pour son dévouement et son encouragement pour la rédaction et la contribution à éditer des ouvrages au nom de la Faculté de Médecine de Tanger.

Nous remercions également tous les membres de l'équipe du Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique du CHU TTA, qui ont contribué malgré leur charge de travail quotidienne activement à l'élaboration et la concrétisation de ce Manuel.

Préface :

L'anatomie et cytologie pathologique est une discipline majeure dans la pratique médicale. C'est une spécialité qui évolue à grande vitesse et requiert de plus en plus d'expertises. Le développement des techniques d'analyses va ainsi de la classique étude macroscopique des pièces d'exérèses puis morphologiques des tissus et cellules pathologiques au microscope après colorations standards, à l'usage des anticorps monoclonaux, aux études de biologie moléculaire qui aujourd'hui apportent un éclairage nouveau dans la caractérisation des maladies. L'anatomo-pathologiste est aujourd'hui un membre à part entière des équipes pluridisciplinaires et contribue à la prise en charge des patients aussi bien au diagnostic que dans le suivi post-thérapeutique.

L'anatomie et cytologie pathologique est une discipline qui requiert une grande rigueur. Les conclusions portées suite à l'analyse sont grandement influencées par les soins donnés aussi bien au processus pré-analytiques que dans les techniques d'études au sein du laboratoire. Le travail d'harmonisation des pratiques au sein du laboratoire et entre les laboratoires d'anatomie et cytologie pathologique est nécessaire pour la fiabilité des conclusions portées.

C'est avec grand plaisir que je vois ce souci de rigueur porté par la jeune équipe d'anatomie et cytologie pathologique du Centre Hospitalier Universitaire Tanger-Tétouan-Al Hoceima et de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Tanger dirigée par le Professeur Mariame Chraïbi. La participation de l'ensemble de l'équipe à la rédaction de cet ouvrage rend compte de la capacité du Pr Mariame Chraïbi à fédérer son équipe autour de ce projet de qualité et augure d'un bon développement de la discipline dans la région nord du pays. L'ouvrage embrasse l'ensemble du processus et prend souvent la forme de mode opératoire pratique. Le lecteur y trouvera l'essentiel à savoir pour pouvoir mettre en place ou améliorer ses pratiques. Bien que des ouvrages traitant du même sujet puissent être disponibles, les productions nationales sont rares. Elles sont cependant indispensables car les pratiques des laboratoires peuvent varier pour prendre en compte les expériences, les ressources et les organisations locales.

Mhamed Harif

Professeur d'Hématologie

Directeur du Centre Hospitalier Universitaire Tanger-Tétouan-AlHoceima

Avant-propos

Confucius

« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie »

Pourquoi élaborer un Manuel technique ?

A qui s'adresse ce Manuel technique ?

L'Anatomie et cytologie pathologique (ACP) est une spécialité médicale particulière qui repose sur une technique fiable pour pouvoir réaliser des comptes rendus et des diagnostics de pointe, sur lesquels les cliniciens et les chirurgiens se basent pour traiter convenablement les patients.

Au Maroc, nous ne disposons pas de manuel technique marocain concernant les techniques utilisées en anatomie et cytologie pathologique. Ce manuel servira de guide pour les techniciens, les résidents et les médecins.

Le manuel a été réalisé par tous les membres de l'équipe. Chacun a contribué à la rédaction de par son expérience en anatomie et cytologie pathologique ainsi que d'autres compétences associées.

Nous avons tenu à décrire des techniques qu'on pratique au sein de notre laboratoire et même d'autres qu'on veut développer. Ce n'est qu'un début et nous serons amenés à faire d'autres éditions pour actualiser et améliorer le travail.

Les chapitres ont été élaborés suivant un ordre pédagogique, visant à faciliter la compréhension des différentes techniques.

Chraïbi Mariame

Chef de service du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique
Centre Hospitalier Universitaire Tanger-Tétouan-Al Hoceima

Auteurs

CHERRAK Imane

Technicienne
Laboratoire d'Anatomie et cytologie
pathologique (ACP)
CHU Tanger -Tétouan- Al Hoceima (TTA)

CHRAÏBI Mariame

Professeure en ACP
Chef de service du laboratoire d'ACP
CHU TTA
Faculté de Médecine et de pharmacie de
Tanger

EL ASYOUTE Wiam

Technicienne
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

EL JIAR Mohammed

Résident en ACP
Laboratoire d'ACP
CHU Tanger -Tétouan- Al Hoceima (TTA)

EL IHIAI Imane

Résidente en ACP
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

EL OUARDI Kaoutar

Technicienne
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

ESSAOUDY Ikram

Technicienne
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

IDRISSI Serhrouchni Karima

Professeure en Histo-embryologie-cytogéné-
tique
Laboratoire d'ACP
CHU TTA
Faculté de Médecine et de pharmacie de
Tanger

KHARMOUN Jinane

Médecin spécialiste en ACP
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

MEZGANI Mouna

Technicienne
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

MOUATAKID Mohammed

Assistant médical
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

SIKAL Nabila

Technicienne
Laboratoire d'ACP
CHU TTA

Sommaire

Remerciements	4
•	
Préface	5
•	
Avant-propos	6
•	
Auteurs	7
•	
Sommaire	8
•	
Liste des figures	9
•	
Liste des tableaux	11
•	
Introduction	12
•	
Circuit des prélèvements dans un laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique	13
•	
Technique standard : déshydratation, inclusion et enrobage, coupe, coloration	28
•	
Cytologie	33
•	
Colorations spéciales	46
•	
Immunohistochimie	59
•	
Immunofluorescence	66
•	
Techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire	72
•	
Digitalisation en anatomie et cytologie pathologique	88
•	
Références	92
•	
Index	96
•	
Lexique	100

Liste des figures :

Figure 1 : Bon de demande d'examen anatomopathologique laboratoire ACP	15
Figure 2 : Les paramètres à respecter dans la phase préanalytique [3]	16
Figure 3 : Consignes à respecter pour les prélèvements destinés au laboratoire d'ACP	18
Figure 4 : Schéma montrant le circuit du prélèvement en ACP	20
Figure 5 : Armoire ventilée pour le stockage des prélèvements (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique, C.H.U TTA)	21
Figure 6 : Acheminement des prélèvements au laboratoire d'ACP (Réf: laboratoire d'anatomie et cytologie pathologie C.H.U. TTA)	22
Figure 7 : Exemple d'examen macroscopique d'une pièce d'hystérectomie (A), d'une résection cutanée (B) et d'une biopsie mammaire (C)	23
Figure 8 : Facteurs influençant la fixation [7]	24
Figure 9 : Table de macroscopie (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)	26
Figure 10 : Appareil de circulation : (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)	29
Figure 11 : Étapes d'enrobage - (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique, C.H.U TTA)	29
Figure 12 : Console d'enrobage - Microtome et exemple d'une coupe de paraffine sur une lame (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique, C.H.U TTA)	30
Figure 13 : Etapes de la coupe (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)	30
Figure 14 : Appareil automatique de coloration (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)	31
Figure 15 : Images histologiques de prélèvements colorés à l'Hématoxyline-Eosine (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)	32
Figure 16 : Etalement manuel d'un produit de cytoponction. (Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie Théorie et pratique, Véronique Marck Laboratoire de pathologie Institut Curie, Paris,2009.)	35
Figure 17 : Principales techniques de traitements des prélèvements cytologiques non gynécologiques	37
Figure 18 : Frottis direct traitement des expectorations. (Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology, Pranab Dey,2017.)	38
Figure 19 : Cytopréparation des liquides par centrifugation (Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology, Pranab Dey,2017.)	39
Figure 20 : Protocole de prise en charge macroscopique du LBA : liquide broncho-alvéolaire	41
Figure 21 : Illustration du score de Golde dans le LBA	41
Figure 22 : Cytopréparation des urines par la technique millipore. (Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology, Pranab Dey,2017.)	42
Figure 23 : Frottis cervico-utérin montrant des cellules superficielles et intermédiaires (Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique C.H.U TTA)	44
Figure 24 : Glomérule rénal montrant une coloration de la membrane basale par le PAS https://pathorama.ch/pathopic/003443/show	47
Figure 25 : Trichrome montrant une coloration en bleu du collagène du derme (https://www.flickr.com/photos/bioalternatives/9149742119/)	48
Figure 26 : Coloration bleuâtre du mucine des cellules épithéliales caliciformes coliques (Laboratoire d'ACP CHU TTA)	49
Figure 27 : Coloration rouge Congo mettant en évidence des dépôts amyloïdes en rouge brique avec coloration en vert pomme sous lumière polarisée.	51
Figure 28 Coloration de Perls montrant des dépôts d'hemosidérine en intra alvéolaire (https://www.flickr.com/photos/pulmonary_pathology/3626657617/)	52

Liste des figures :

Figure 29 Bacilles acido-alcool-résistants (phil.cdc.gov CDC-PHIL ID #5789)	53
Figure 30 Coloration par orcéine des fibres élastiques d'une paroi artérielle (http://education.med.nyu.edu/Histology/courseware/modules/stains/stains8.html)	55
Figure 31 Coupe histologique montrant une coloration MGG (Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique CHU TTA)	56
Figure 32 Coloration à la réticuline d'un parenchyme hépatique (https://abdominalkey.com/benign-hepatocellular-tumors/)	57
Figure 33 Système de révélation immunohistochimique - Kits ABC (Complexe Avidine/Biotine)	60
Figure 34 Unité de prétraitement des coupes PT Link - Laboratoire d'ACP, CHU TTA	61
Figure 35 Automate d'Immunohistochimie - Laboratoire d'ACP, CHU TTA	62
Figure 36 : Etude immunohistochimique des récepteurs hormonaux, absence de marquage des cellules tumorales (A), et présence d'un marquage nucléaire d'intensité modérée (B) et d'intensité forte (C) (Laboratoire d'ACPT CHU TTA)	62
Figure 37 : Etude immunohistochimique des récepteurs Her2 : A) Score 1+; marquage membranaire faible incomplet. B,C) Score 2+ Equivoque: marquage membranaire modéré complet. D) Score 3+ : Marquage membranaire fort complet sur >10% des cellules tumorales	63
Figure 38 Schéma montrant la fixation de l'Anticorps primaire-couplé à la protéine fluorescente- sur le bioagresseur : IFD.	67
Figure 39 Schéma résumant le principe de l'immunofluorescence indirecte.	67
Figure 40 : Schéma général du déroulement de l'IF (ACPT)	69
Figure 41 Procédure de demande d'analyse moléculaire	73
Figure 42 : Circuit du prélèvement au Laboratoire de biopathologie.	74
Figure 43 : schéma de technique FISH (Sonde de fusion) (Alice Boyez, Johnny Salloum. Anatomic pathology. Hématologie. 2017;23:5-12. doi:10.1684/hma.2017.1201)	75
Figure 44 : Schéma de technique FISH (Sonde Break Apart) (Alice Boyez, Johnny Salloum. Anatomic pathology. Hématologie. 2017;23:5-12. doi:10.1684/hma.2017.1201)	75
Figure 45 : schéma montrant les étapes de la technique FISH ACPT.	77
Figure 46 : Amplification du gène HER-2 au niveau des noyaux des cellules tumorales d'un carcinome mammaire (fluorochrome rouge) étudiée par technique d'hybridation fluorescente in situ (× 100) (Frédérique Penault-Llorca et al. Mise à jour 2014 des recommandations du GEFPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein en France. Annales de pathologie (2014) 34, 352—365)	77
Figure 47 : Principe de la PCR. La technique est basée sur la répétition de cycles de transition de température qui alternent après une phase de dénaturation initiale des molécules d'ADN. Le mélange réactionnel contient l'ADN ou l'ADNc, la polymérase, les nucléotides et les amorces spécifiques permettant d'amplifier la région d'intérêt. Le nombre de cycles (n) constitués d'étapes de dénaturation, hybridation, élongation est généralement supérieur à 30. [39]	78
Figure 48 : La technique de l'amplification de l'ADN par QPCR (ex : Technologie Taqman) . [40]	79
Figure 49 : Schéma résumant différents étapes du séquençage haut débit	85
Figure 50 : Schéma simplifié de pyroséquençage.	85
Figure 51 : Séquençage par nanopore d'oxford nanopore technologie.	86
Figure 52 Types de moyens d'imagerie utilisés en anatomie pathologique digitale [57]	89
Figure 53 Flux de travail simplifié en pathologie digitale.	90
Figure 54 Image d'un scanner de lames.	91
Figure 55 Exemple d'un logiciel qui permet la visualisation des images histologiques virtuelles. [59]	91

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Le type de fixation selon le type de l'examen cytologique.	19
Tableau 2 : Comparaison entre les colorations de Papanicolaou et MGG [16]	45
Tableau 3 : Quelques problèmes rencontrés durant l'IHC, leurs causes probables et l'action préventive à adopter	64
Tableau 4 : Un tableau comparatif entre la PCR et la qPCR [45]	80
Tableau 5 : Différents réactifs utilisés dans la technique q PCR	81
Tableau 6 : Avantages et inconvénients de la q-PCR.	82

Introduction

L'anatomie et cytologie pathologique (ACP) est une spécialité médicale qui se base sur l'analyse morphologique des tissus et des cellules pour établir un diagnostic. Elle a connu une révolution avec l'intégration des techniques de biologie moléculaire et de cytogénétique. Ce qui rend cette discipline à la fois passionnante et difficile, c'est que le diagnostic final se base sur un raisonnement scientifique bien ficelé basé sur les renseignements cliniques, biologiques, radiologiques et morphologiques sans oublier de prendre en considération les techniques complémentaires notamment l'immunohistochimie et les techniques de cytogénétique et de Biologie moléculaire.

L'étude anatomo-pathologique passe par trois phases :

La phase pré-analytique : Elle est la phase la plus concernée par les non conformités. Cette phase inclut la gestion de l'échantillon dès son prélèvement jusqu'à sa réception au laboratoire d'ACP et sa fixation. Les critères d'acceptation des échantillons doivent être définis par écrit et validés par les services de soins.

La phase-analytique : Elle comprend le traitement des prélèvements en se basant sur des techniques histopathologiques, cytologiques, immunohistochimiques ou d'autres techniques complémentaires.

Pour assurer le bon déroulement du circuit, il est nécessaire de suivre certaines recommandations au niveau de chaque étape technique. Il faut optimiser la mise en place des méthodes automatisées.

La phase post-analytique : Elle concerne la réalisation et la validation du compte rendu anatomopathologique.

Les objectifs de ce manuel technique :

- Expliquer le circuit des prélèvements
- Décrire les techniques standards
- Décrire les techniques complémentaires
- Expliquer les techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire



Chapitre 1

Circuit des prélèvements dans un laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique

- IDRISSE Karima
- KHARMOUM Jinane
- EL JAR Mohammed
- SERBOUTI Jinane
- CHRAÏBI Mariame

Les conditions d'un prélèvement de qualité en ACP

Le laboratoire d'ACP analyse différents types de prélèvements tels que les pièces opératoires, les biopsies, les frottis cytologiques, gynécologiques et non gynécologiques, les ponctions d'organes profonds.

Le prélèvement doit être effectué dans le strict respect des conditions médicotekniques et sanitaires visant à assurer la qualité de lecture pour le bon suivi et la sécurité du patient.

Chaque prélèvement est accompagné d'un bon de demande d'examen anatomo-pathologique.

Voir (figure 1). La qualité du bon de demande est conditionnée par la qualité des renseignements cliniques, paracliniques et la conformité des prélèvements, qui jouent un rôle majeur dans la contribution à un compte rendu anatomopathologique de qualité.

Les informations à fournir dans le bon de demande d'examen anatomopathologique sont les informations médico-administratives qui doivent être libellées de manière précise, lisible, sans abréviation et non équivoque sur le bon de demande d'analyse. Elles concernent :

- Le patient : nom, prénom, sexe, date de naissance
- Le prélèvement : nature, localisation, date et heure de prélèvement, orientation du prélèvement en cas de pièce opératoire
- Les renseignements cliniques et para cliniques pertinents, les résultats de l'observation macroscopique in vivo et les examens prescrits.
- Le prescripteur : nom, prénom, et signature.

En outre, l'identification du patient et la nature du prélèvement doivent également figurer dans le flacon contenant le prélèvement [1] [2].

DEMANDE D'EXAMEN ANATOMO-PATHOLOGIQUE

Numéro d'anapath : Service demandeur :

Date du prélèvement :/...../..... Date de réception :/...../.....

Nom :	Prénom :
Age :	Sexe :
Numéro D'entrée :	Numéro de téléphone :

Siège du prélèvement :	Nombre de fragments :
Nature du prélèvement : ✦ Cytologie : ▪ lame étalée ▪ milieu liquide ✦ Biopsie ✦ Pièce opératoire ✦ Bloc de paraffine (relecture) ✦ Biopsie exérèse cap ✦ Examen extemporané ✦ Lame (relecture)	
Orientation du prélèvement :	

Renseignements cliniques :
Bilan radiologique :
Bilan biologique :
Examen anatomo-pathologique antérieur : ○ référence anatomo-pathologique CRO Tanger : ○ résultat si externe :

Signature du médecin demandeur :

Figure 1 : Bon de demande d'examen anatomopathologique laboratoire ACP

La gestion du prélèvement commence dès l'intervention chirurgicale, et dès que l'échantillon n'est plus irrigué par la circulation sanguine. Les paramètres à contrôler concernent les temps d'ischémie, divisés en deux temps : ischémie chaude et ischémie froide. Voir (figure 2).

L'ischémie chaude, concerne uniquement les prélèvements lors d'une intervention chirurgicale, correspond au délai entre la ligature artérielle chirurgicale et la résection opératoire. Ce temps peut être apprécié et colligé au bloc opératoire. Il dépend en particulier de la complexité de l'intervention et de la dextérité du chirurgien. Les acides nucléiques (en particulier l'ARN) de certains organes et tissus (ganglion lymphatique, tube digestif, pancréas, poumon) sont plus sensibles à ce temps d'ischémie chaude que d'autres (sein, thyroïde, foie) [3] [4].

Le temps d'ischémie froide est défini par le temps écoulé entre le moment où le prélèvement tissulaire est extrait du corps humain, par biopsie ou exérèse chirurgicale, et le moment où le tissu est au contact du fixateur.

La fixation est une étape essentielle dans la préparation tissulaire, permet de prévenir l'autolyse et de conserver la structure des tissus.

Seuls les prélèvements histologiques fixés au formol tamponné à 10% pourront être analysés par les techniques de biologie moléculaire et d'immunohistochimie accréditées. Les flacons de formol sont mis à la disposition des services et envoyés sur demande des préleveurs. Aucun autre type fixateur ne sera accepté

Le temps d'ischémie froide doit être le plus court possible, quelques minutes pour le prélèvement biopsique et moins d'une heure pour une pièce opératoire.

Pour les pièces opératoires, il y a plusieurs conditions selon le délai de transport et la taille de la pièce opératoire :

- Si le transport des prélèvements se fait dans le plus bref délai (moins d'une heure), la pièce opératoire peut être adressée au laboratoire d'ACP à l'état frais.
- Si le délai de transport/réception entre le bloc opératoire et le laboratoire est long (dans la journée) ou la pièce opératoire est de petite taille, les prélèvements doivent être adressés au laboratoire dans le fixateur.
- Si le délai de transport/réception entre le bloc opératoire et le laboratoire est long (au-delà d'une journée) ou la pièce opératoire est de grande taille, plusieurs options sont possibles :
 - + Le transport à l'état frais dans une enceinte réfrigérée à 4°C
 - + La mise sous vide puis la conservation 48 h à 4°C avant fixation dans le formol

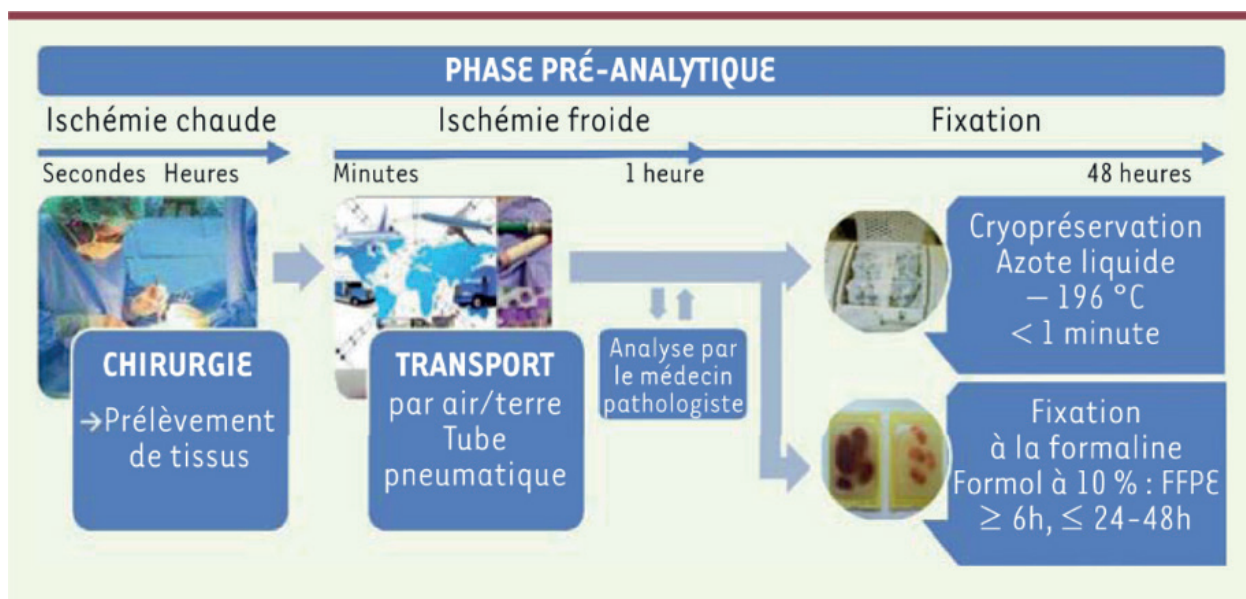


Figure 2 : Les paramètres à respecter dans la phase préanalytique [3]

Les prélèvements peuvent être acheminés dans tout type de récipient ou sac plastique hermétiquement fermé. Il est souhaitable d'informer le laboratoire sur le statut infectieux avéré ou supposé (HIV, hépatite C, ...) du prélèvement. La quantité de formol doit recouvrir en totalité l'échantillon et correspondre à au moins 10 fois son volume. Il faut identifier le prélèvement par une étiquette et numéroter les flacons s'il s'agit de plusieurs, voir (figure 3).

Certains prélèvements doivent être adressés au laboratoire d'ACP sans fixation. Il s'agit de prélèvements urgents, qui doivent être acheminés rapidement au laboratoire, à savoir l'examen extemporané, le fœtus, la biopsie musculaire et les prélèvements destinés pour étude en immunofluorescence. [6]

L'examen extemporané

[1] [6]

C'est un examen demandé par un chirurgien lors d'un acte chirurgical alors que le patient est toujours en salle d'opération. Cet examen a pour but d'orienter ou de conditionner le geste thérapeutique chirurgical en fonction de la pathologie rencontrée lors de l'intervention.

Ce type d'examen est considéré comme urgent. Le résultat doit être communiqué dans les 30 à 40 min (acte technique, lecture par un pathologiste et transmission de l'information en salle d'opération du patient). Le matériel doit être envoyé à l'état frais sans fixateur ni solution de préservation. Ce type d'examen est obligatoirement suivi par un contrôle du résultat obtenu par l'inclusion en paraffine du fragment tissulaire examiné extemporanément. Le résultat de l'extemporané et son contrôle seront précisés dans le compte rendu final.

Il faut toutefois noter que les techniques rapides utilisées pour ce type d'examen altèrent la morphologie tissulaire et peuvent rendre difficile leur analyse ultérieure même après fixation et inclusion en paraffine.

Le prélèvement destiné pour technique d'immunofluorescence [1]

Les biopsies destinées aux techniques d'immunofluorescence à savoir les biopsies cutanées et rénales sont placées dans le milieu de préservation de Michel.

Le choix du milieu de préservation est réalisé par le prescripteur car une biopsie fixée au formol ne peut pas être ensuite transférée dans le milieu de Michel ou congelée en vue de la réalisation de technique d'immunofluorescence.

La biopsie musculaire

Les biopsies musculaires ne doivent pas être fixées au formol, doivent être conservées à froid et acheminées au laboratoire d'ACP dans moins d'une heure pour faire réussir la technique d'histoenzymologie.

Le fœtus

Le fœtus doit être acheminé l'état frais sans fixation, et dans les brefs délais, pour pouvoir réaliser une autopsie et des prélèvements pour étude cytogénétique.

CONSIGNES A RESPECTER POUR LES PRELEVEMENTS DESTINÉS AU LABORATOIRE D'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE


- **Bien remplir la fiche de demande d'examen anatomopathologique (++++):**
 - Clinique
 - Biologie
 - Radiologie
- Orienter la pièce opératoire (Repères de l'orientation)
- Vérifier la disponibilité et la validité du fixateur (formol tamponné à 10%) et la disponibilité d'un récipient adéquat
- **NE PAS DISSEQUER LA PIÈCE OPÉRATOIRE (++++)**
- Fixer la pièce opératoire immédiatement après la résection chirurgicale
- Le volume du fixateur doit être suffisant (5 à 10 fois le volume de la pièce)
- Le récipient doit être de taille suffisamment grande pour prévenir les déformations des pièces opératoires volumineuses
-  **NE PAS FIXER UN PRELEVEMENT DESTINÉ POUR EXAMEN EXTEMPORANÉ**
- **Ne pas fixer un prélèvement destiné pour Immunofluorescence**

Figure 3 : Consignes à respecter pour les prélèvements destinés au laboratoire d'ACP

Les prélèvements cytologiques [1] [6]

La cytologie est l'étude microscopique des cellules en dehors de toute organisation tissulaire.

La cytologie comporte la cytologie exfoliative, la cytologie de ponction et de brossage.

La cytologie exfoliative concerne les urines, le liquide céphalo-rachidien, les liquides d'épanchement pleural, péricardique et péritonéal.

La cytologie de brossage est réalisée au moyen d'une brosse et intéresse les épithéliums bronchiques, bilio-pancréatique, œsophagiens et cervico-utérin.

La cytoponction d'organes comme le sein, la thyroïde, le pancréas, le globe oculaire ou tout organe profond sont réalisés à l'aiguille fine.

Les prélèvements cytologiques parviennent soit à l'état frais, soit le plus souvent fixés, le matériel étant déposé dans un flacon de fixateur et/ou étalé sur des lames par le clinicien.

Les prélèvements cytologiques frais (non encore fixés) à savoir le liquide céphalo-rachidien (LCR), le lavage bronchoalvéolaire (LBA) et le liquide articulaire doivent être acheminés rapidement au laboratoire moins de 30 minutes.

Pour les prélèvements cytologiques fixés, il y a plusieurs types de fixations possibles (Tableau 1) :

Alcool : Fixation immédiate en quantité équivalente au volume du liquide

Lames fixées : vaporiser un spray fixateur à + de 20 cm de la lame, laisser sécher avant de ranger dans les porte-lames.

Lames sèches : sécher à l'air libre au moins 10 mn avant de ranger dans les porte-lames.

Milieu liquide : détacher et déposer la tête de la brosse dans le flacon de fixateur après réalisation du frottis.

Tableau 1 : Le type de fixation selon le type de l'examen cytologique.

Type du prélèvement cytologique	Traitement utilisé
Liquide urinaire, liquide pleural, liquide péricardique, liquide d'ascite ou péritonéal, aspiration bronchique	Alcool
Frottis cervico-vaginaux en cytologie conventionnelle	Lames fixées
Frottis cervico-vaginaux en cytologie en couche mince	Milieu liquide
Ponctions d'organes profonds : prélèvement purement liquidien	Alcool
Ponctions d'organes profonds : prélèvement superficiel	Etalement : lames sèches

Circuit des prélèvements en ACP :

Les prélèvements parvenus au laboratoire d'ACP passent par le même circuit. D'abord une étape d'acheminement et d'enregistrement ou réception des prélèvements, l'examen macroscopique, la fixation, l'inclusion, l'enrobage, la coloration standard et enfin la lecture au microscope (voir figure 4).

Les lames et les blocs sont archivés pour une éventuelle lecture ou colorations complémentaires.

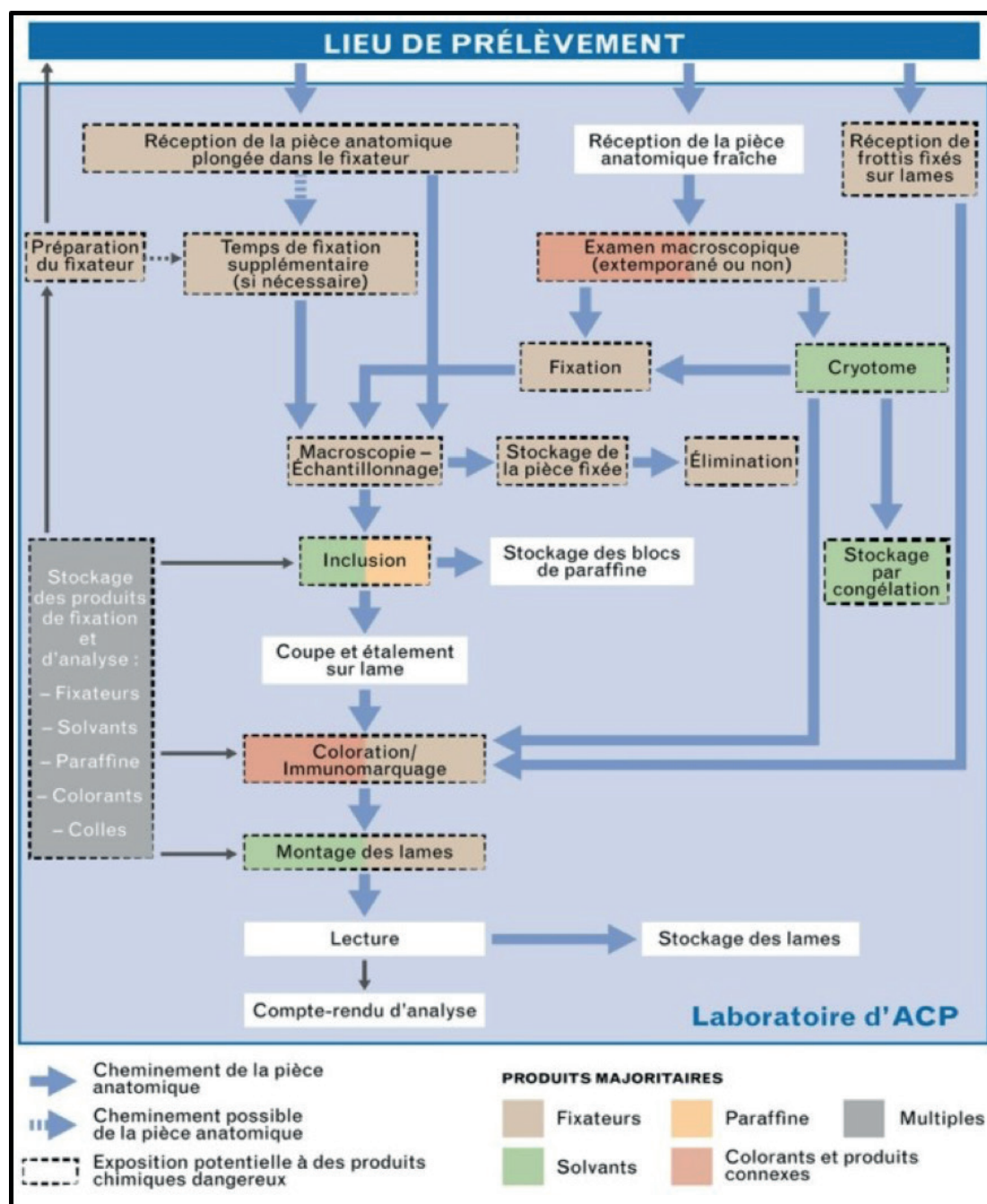


Figure 4 : Schéma montrant le circuit du prélèvement en ACP



Figure 5 : Armoire ventilée pour le stockage des prélèvements

(Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique, C.H.U TTA)

I. Acheminement, réception et enregistrement des prélèvements

L'acheminement des prélèvements (figure 6)

L'acheminement des prélèvements constitue une étape cruciale, conditionnant la qualité des prélèvements.

- Il faut placer les prélèvements dans des récipients adaptés et étanches, dont le contenu est clairement identifié.
- S'assurer de l'étanchéité des récipients après leur fermeture.
- Veiller à ne pas souiller la fiche de suivi du prélèvement ; pour cela placer le récipient dans un sac plastique transparent contenant une pochette séparée pour la fiche de suivi.
- Prévoir un lieu de transmission des prélèvements propre et ventilé muni d'un plan de travail, adapté au volume des prélèvements à transporter, à l'usage du coursier.
- Prévoir des contenants fermant de façon étanche pour le transport des prélèvements (caisses, sacs...) et strictement réservés à cette fonction.
- Elaborer des procédures précisant les modalités de conditionnement, les conditions et délais d'acheminement des prélèvements de routine et des prélèvements en cas de risque d'infection.

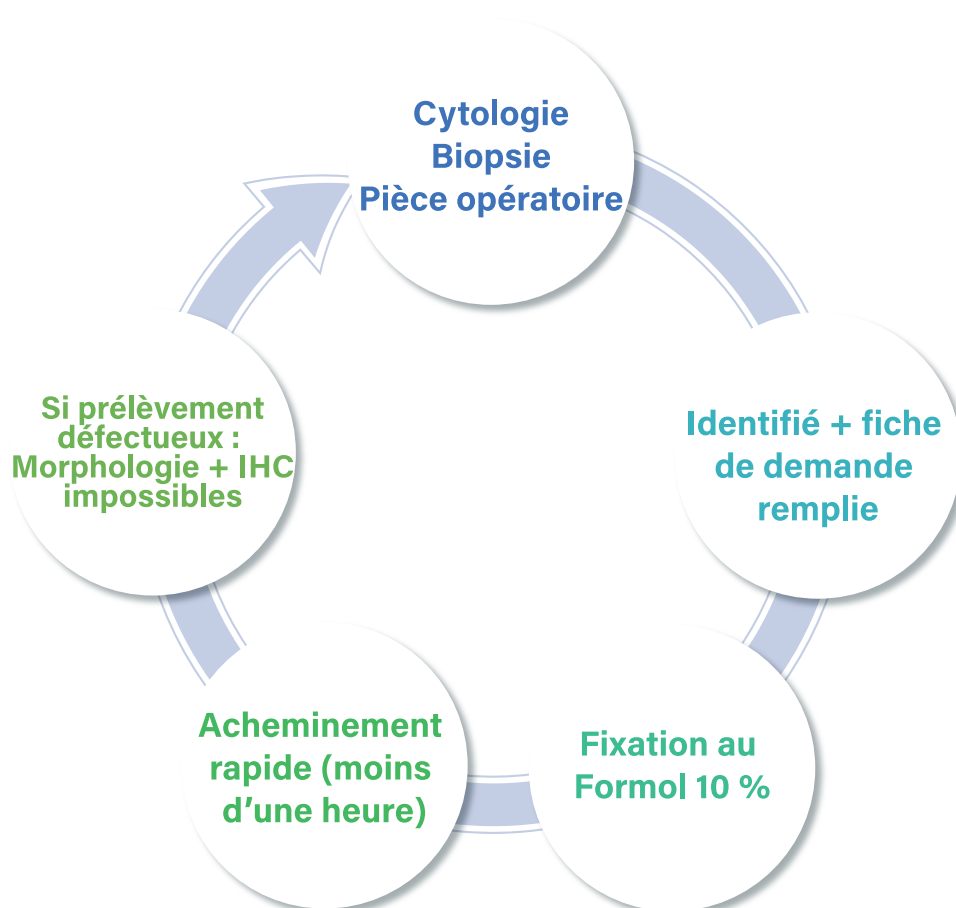


Figure 6 : Acheminement des prélèvements au laboratoire d'ACP
(Réf: laboratoire d'anatomie et cytologie pathologie C.H.U. TTA)

La réception des prélèvements

La réception des prélèvements au sein du laboratoire d'ACP, doit respecter certaines étapes.

- Définir un emplacement réservé pour la réception des demandes d'examen et des prélèvements, propre et aéré avec un plan de travail, adapté au volume des prélèvements collectés, à l'usage du coursier.
- Assurer un plan de travail muni de ventilation à flux horizontal entrant, avec un éclairage permettant de lire sans effort les étiquettes des récipients placés dans l'enceinte ventilée.
- Assurer les moyens de protection individuelle et la conduite à tenir en cas d'exposition accidentelle au formol ou au sang à la réception.
- Mettre à disposition une procédure concernant la gestion des prélèvements non conformes au personnel chargé de la réception et savoir détecter les causes de non-conformité.

L'enregistrement des prélèvements

Les prélèvements reçus au laboratoire d'ACP suivent des recommandations précises :

- Définir un emplacement réservé pour la réception des demandes d'examen et des prélèvements, propre et aéré avec un plan de travail, adapté au volume des prélèvements collectés, à l'usage du coursier.
- Enceinte de réception à façade ouverte, avec une ventilation à flux horizontal avec un éclairage permettant de lire sans effort les étiquettes des récipients placés dans l'enceinte ventilée.
- Assurer les moyens de protection individuelle et la conduite à tenir en cas d'exposition accidentelle au formol ou au sang à la réception.

- Mettre à disposition une procédure décrivant les actions à accomplir lors de la réception des prélèvements au personnel chargé de la réception.
- Décliner les actions en fonction des caractéristiques du prélèvement.
- Mettre à disposition une procédure concernant la gestion des prélèvements non conformes au personnel chargé de la réception et savoir détecter les causes de non-conformité.
- Vérifier la conformité des prélèvements : l'identité du malade, le numéro du dossier, les renseignements cliniques, l'organe prélevé, le fixateur utilisé, le respect du délai d'acheminement, le nombre de flacons, le médecin prescripteur.
- Attribuer des codes d'identification du laboratoire.

Etape de macroscopie (figure 7) [7]

L'étude macroscopique conditionne la qualité du compte rendu anatomopathologique. L'examen macroscopique est réalisé par un médecin anatomo-pathologiste et permet une étude macroscopique des prélèvements reçus, qui se font sur une table de macroscopie spéciale équipée de système de ventilation performant lié au système de ventilation interne. La table de macroscopie doit être dotée de filtres avec compteurs destinés à absorber les particules de formol contenues dans l'air après manipulation des pièces fixées. Selon la nature des prélèvements, le protocole macroscopique diffère.

- Pour les biopsies, on détermine le nombre de fragments, on mesure leurs tailles et on les dépose en sandwich dans des cassettes déjà identifiées.
- Pour les pièces opératoires, il y a des protocoles standardisés adaptés qu'il faut suivre pour réaliser un échantillonnage en fonction de chaque type de pièce. La première étape passe par un examen frais de la pièce, il faut prendre une photo, la peser (organe plein), la mesurer, encrer les limites de résection, faire des tranches selon la nature de la pièce tout en gardant l'orientation. La seconde étape est la fixation.
- Pour les prélèvements ossifiés, il faut établir une technique pour les assouplir qui est la décalcification et qui permet de baisser la quantité de calcium contenue dans les os.

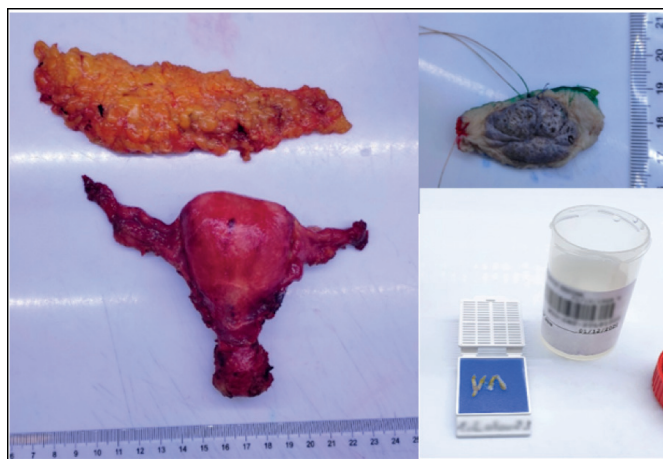


Figure 7 : Exemple d'examen macroscopique d'une pièce hystérectomie (A), d'une résection cutanée (B) et d'une biopsie mammaire (C)

La fixation [8] [9]

La fixation des prélèvements est une étape essentielle dans la préparation tissulaire, permet de prévenir l'autolyse et de conserver la structure des tissus.

Les facteurs influençant la fixation sont :

- Température
- PH
- Taille des tissus
- Volume (fixateur/ tissu)
- Temps

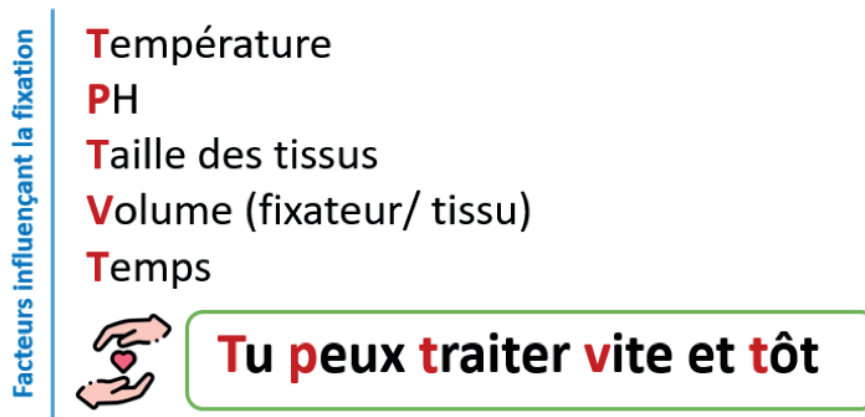


Figure 8 : Facteurs influençant la fixation [7]

La température : la température idéale est entre 0°C et 4°C.

Le PH : le PH optimal pour une bonne fixation est entre 7,2 et 7,4.

La taille des tissus :

Organes creux : ils doivent être ouverts et si nécessaire lavés de leur contenu afin de prévenir l'autolyse des muqueuses.

Organes pleins :

- Volumineux : ils doivent être coupés en tranches pour faciliter la pénétration rapide et homogène du fixateur.
- Poumons : ils peuvent être fixés par insufflation d'une solution de formol dans les bronches ou coupés en tranches.
- Tissu cérébral : il doit être plongé dans le fixateur sans être tranché en raison de la fragilité de la substance cérébrale.
- Prélèvements calcifiés (os, certaines tumeurs) : ils doivent être sciés, fixés, puis plongés dans une solution décalcifiante (acide).

Le volume du fixateur :

Le formol tamponné à 10% est le fixateur optimal permettant une limitation de la dégradation des acides nucléiques, une étude morphologique directe et une bonne analyse pour les techniques d'immunohistochimie et de biologie moléculaire

- Le volume du fixateur doit représenter environ 10 fois le volume de la pièce
- Le récipient doit être de taille suffisamment grande pour prévenir les déformations des pièces opératoires volumineuses.

Le temps de fixation :

Il présente l'intervalle de temps entre le prélèvement et la fixation : pour une fixation optimale, l'immersion du prélèvement dans le fixateur sera réalisée immédiatement et tout au plus dans un délai d'une heure.

La durée de fixation :

- Biopsies : minimum de 2h à 6h (suivant le volume du prélèvement)
- Pièces opératoires : la durée dépendra du volume du prélèvement et sera définie par le pathologiste en charge du prélèvement. En général : 48 à 72 h.



Figure 9 : Table de macroscopie

Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)

Gestion des prélèvements calcifiés : décalcification [10] [11]**Définition**

La décalcification est une opération permettant d'enlever les sels de calcium présents dans le tissu afin de faciliter leur manipulation lors de l'étude macroscopique et la microtomie.

Principe

Le principe de la décalcification diffère selon le réactif utilisé :

- Solubilisation du calcium par un agent acide : les sels de calcium tissulaire sont insolubles et au contact d'un acide ils se dissolvent.
- Enlèvement du calcium par un agent chélateur : forme avec le calcium des complexes solubles mais non ionisés.

Technique**Matériels**

- Acide nitrique 10 à 15%.
- Eau puis acide : verser une petite quantité d'eau dans le récipient avant de verser l'acide concentré.

- Préparation de 100ml de l'acide nitrique à 10%
Eau distillée..... 90ml
Acide nitrique concentré de commerce (à 70%)..... 10ml
- Préparation de 100ml de l'acide nitrique à 15%
Eau distillée..... 85ml
Acide nitrique concentré de commerce (à 70%)..... 15ml
- Produit de décalcification prêt à l'emploi OsteoRAL R.

Protocole

Protocole de décalcification d'une BOM

- Fixation pendant 18 à 24h.
- Mise en place de la carotte biopsique dans l'Acide nitrique 10 à 15% ou un produit de décalcification prêt à l'emploi OsteoRAL R.
- Durée entre 1 à 4 heures.
- Rinçage à l'eau courante avant de fixer.
- Fixation pendant 4 heures.

Protocole de décalcification d'une pièce opératoire

- Fixation pendant 48h.
- Mise en place de la tranche de section dans l'Acide nitrique 10 à 15%.
- Alternance des cycles de 4heurs de décalcification/ 20heures de fixation.
- Rinçage abondant à l'eau courante (si la décalcification est terminée) avant de fixer.
- Fixation pendant 20 heures.

Validation

L'efficacité de la décalcification sera vérifiée par le contrôle à l'aiguille ou coupe au bistouri.



Chapitre 2

**Technique standard :
déshydratation, inclusion
et enrobage, coupe,
coloration**

- KHARMOUM Jinane
- EL JIAR Mohammed
- EL OUARDI Kaoutar
- CHRAÏBI Mariame

La déshydratation (figure 10)

C'est une étape essentielle pour tous les prélèvements tissulaires. Elle consiste à remplacer l'eau intracellulaire par la paraffine en passant par différentes étapes qui sont :

La fixation par le formol, la déshydratation qui consiste à débarrasser le tissu de toute trace d'eau et se fait par l'alcool, l'éclaircissement par le toluène qui va remplacer l'alcool contenu dans le tissu et l'imprégnation en paraffine qui rend le tissu facile à la coupe.

On décrit ci-dessous un des protocoles de déshydratation possible :

- Remplir : 1 bain de formol, 6 bains d'alcool à concentration croissante, 3 bains de toluène, 4 bains de paraffine.
- Vérifier et changer les bains selon un planning préétabli.
- Placer les paniers remplis par les cassettes dans l'appareil et la programmer.

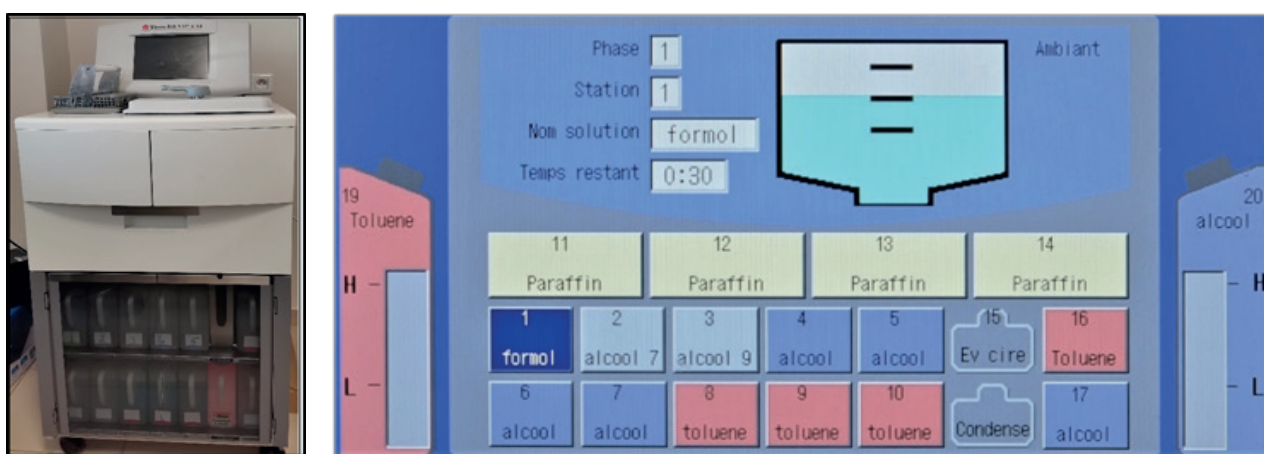


Figure 10 : Appareil de circulation : (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)

L'enrobage ou l'inclusion (figure 11)

C'est une étape qui se base sur la couverture du tissu déshydraté par la paraffine afin d'obtenir un bloc qui permettra au prélèvement de garder ses propres caractéristiques.

Dans l'appareil d'enrobage, il faut :

- Placer les cassettes dans la zone chaude de l'appareil.
- Vérifier les fragments avec les fiches de chaque prélèvement.
- Déposer les fragments dans les moules correspondants et ajouter leurs cassettes.
- Remplir le tout par la paraffine.
- Laisser solidifier dans une plaque refroidissante et les démouler.

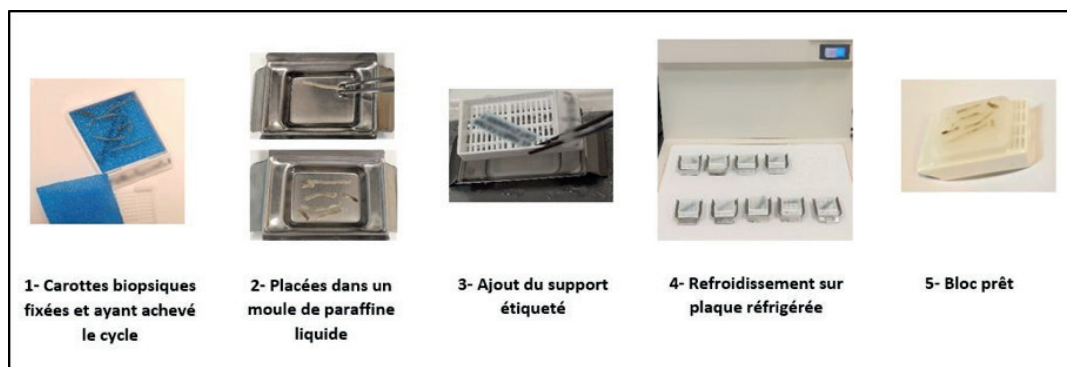


Figure 11 : Étapes d'enrobage - (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique, C.H.U TTA)

La microtomie (figure 12)

La coupe des prélèvements est réalisée grâce à des microtomes. L'épaisseur souhaitée pour les prélèvements est entre 3 à 5 μm . Les étapes à respecter pour la microtomie sont les suivantes :

- Régler l'épaisseur entre 3 à 5 μm et contrôler l'angle de coupe.
- Réaliser des coupes fines (rubans).
- Déposer les rubans sur une lame au sein du bain marie et collecter la bonne coupe.
- Enlever le bloc du microtome et identifier la lame.
- Réchauffer les lames dans l'étuve à 98°C.



Figure 12 : Console d'enrobage - Microtome et exemple d'une coupe de paraffine sur une lame
(Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique, C.H.U TTA)

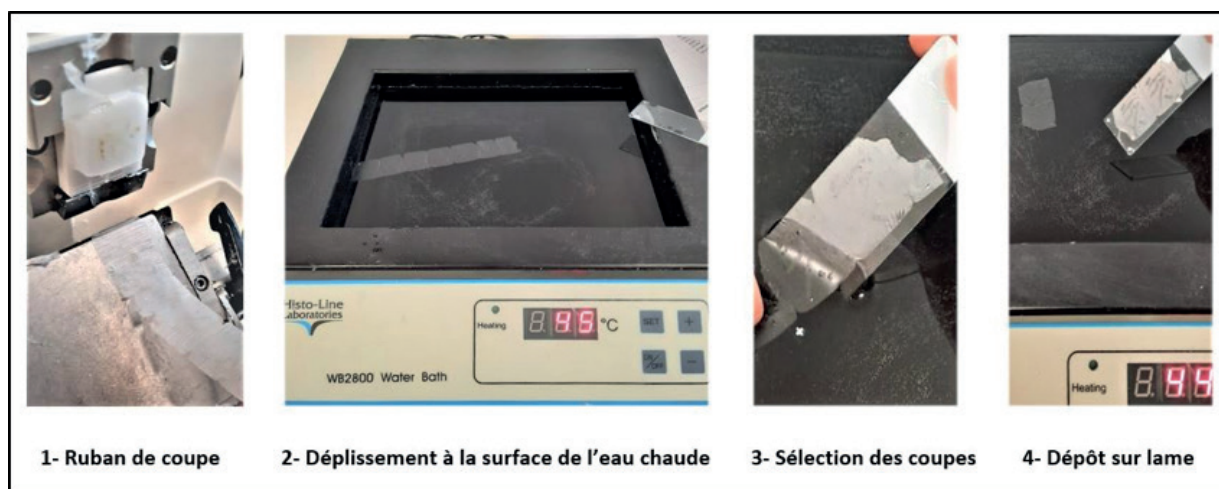


Figure 13 : Etapes de la coupe (Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)

La coloration Hématoxyline-Eosine (H.E)

Une fois les autres étapes sont réalisées, la coloration des lames se fait grâce à la coloration HES (Hématoxyline, éosine, safran).

Définition

La coloration standard est une coloration en histologie qui permet l'analyse des tissus sains et pathologiques. Elle permet au pathologiste de se faire une idée de la pathologie présente et d'avoir une vision globale de la morphologie des tissus (noyau, cytoplasme et collagène). [12]

Principe :

Coloration histologique, associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline de harris à une coloration des cytoplasmes et du collagène par l'éosine. L'éosine colore les cytoplasmes en rose et les fibres dans une gamme de roses plus ou moins vifs selon l'acidophilie des différents éléments. [13]



Figure 14 : Appareil automatique de coloration
(Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)

Technique

Réactifs

Les réactifs nécessaires pour la coloration HE sont :

- Hématoxyline prêt à l'emploi
- Eosine

Mode opératoire [7]

La coloration HE se fait soit par une technique manuelle soit par un automate de coloration. Les étapes de la coloration manuelle HE sont les suivantes :

- Déparaffinage par le toluène (3 bains : passage dans chacun et 10 min dans le 3ème bain),
- Réhydratation par l'alcool à concentration décroissante (3 bains, passage dans chacun),
- Lavage à l'eau de robinet,
- Coloration à l'hématoxyline pendant 10 min,
- Lavage à l'eau de robinet,
- Différenciation par carbonate de lithium (passage),
- Lavage à l'eau de robinet,
- Coloration à l'éosine 35s,
- Lavage à l'eau de robinet,
- Déshydratation par l'alcool à concentration croissante (3 bains, un passage par bain),
- Imprégnation des lames dans un bain de toluène,
- Montage entre lame et lamelle à l'aide de la colle,
- Visualisation au microscope.

Résultats [11]

Collagène	rose pâle
Muscle	rose foncé
Cytoplasme acidophile	rouge
Basophiles	pourpre
Noyaux	bleu
Érythrocytes	rouge cerise
Fibres élastiques	rose vif

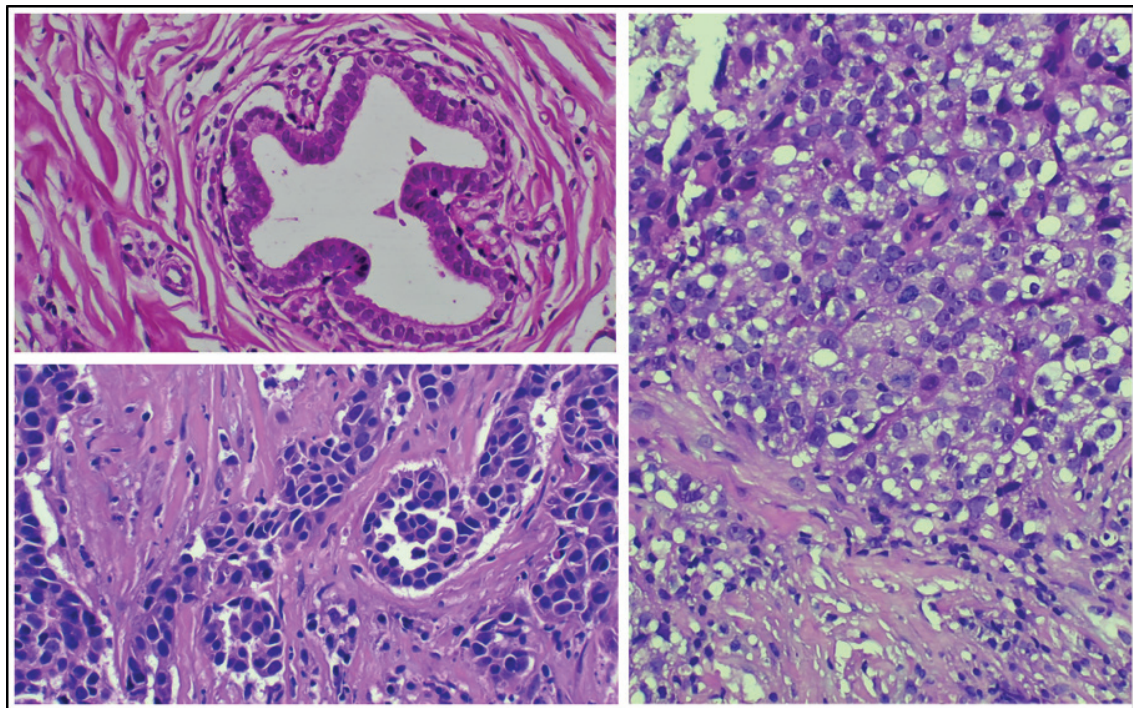



Figure 15 : Images histologiques de prélèvements colorés à l'Hémaléine-Eosine
(Réf : Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, C.H.U TTA)



Chapitre 3 **Cytologie**

- EL IAHLI Imane
- EL JAR Mohammed
- EL OUARDI Kaoutar
- CHRAÏBI Mariame

La cytologie est l'examen microscopique des cellules, isolées ou en petits amas, étalées sur lame de verre et colorées. Ces cellules sont soit exfoliées à partir des surfaces épithéliales ou retirées de divers tissus. Elle permet d'étudier les détails cellulaires tel que la taille et la forme cellulaire, leur mode de groupement, l'aspect de la chromatine, ainsi que le type des substances intercellulaires. L'avantage principal de la cytologie est de fournir un résultat le même jour, voire dans l'heure qui suit le prélèvement, car les méthodes et les techniques en cytologie sont rapides à réaliser.

La cytologie exfoliative

La cytologie exfoliative concerne les cellules qui ont été éliminées de la surface épithéliale de divers organes et qui communiquent avec le milieu extérieur. Ces cellules peuvent être prélevées sur les surfaces épithéliales par grattage de surface, aspiration ou lavage. En effet dans les affections malignes ou infectieuses, l'exfoliation devient exagérée et les cellules épithéliales présentent des variations de morphologie, donnant des informations sur l'épithélium vivant dont elles sont issues [14].

Cytologie cervicale

La cytologie cervicale est le type de prélèvement le plus fréquemment reçu dans un laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique. C'est une méthode largement utilisée à travers le monde pour réaliser des dépistages de masse du cancer du col chez les populations asymptomatiques. C'est George Papanicolaou qui a présenté en 1928 la cytologie comme outil de détection des états cancéreux et précancéreux du cancer du col utérin [14].

Conditions idéales d'un prélèvement gynécologique

Le prélèvement doit idéalement être effectué [15] :

- Lors de la phase ovulatoire du cycle menstruel (en dehors de la phase menstruelle).
- Plus de 48 heures après que la patiente ait effectué une douche vaginale ou qu'elle ait appliqué une crème ou gelée contraceptive.
- Plus de 24 heures après la dernière relation sexuelle de la patiente.

Il existe deux techniques de réalisation du frottis cervico-vaginal : la technique conventionnelle et la technique en milieu liquide.

Prélèvement gynécologique conventionnel

Le prélèvement gynécologique conventionnel consiste à prélever des cellules du col utérin, puis à les étaler sur une lame et à les fixer à l'aide d'un fixateur en aérosol. Ce prélèvement est effectué à l'aide d'une spatule d'Ayre, d'une tige montée ou d'une « cytobrosse » [15].

Prélèvement gynécologique en milieu liquide

Le frottis en milieu liquide correspond à un prélèvement où les cellules sont placées en suspension dans un liquide de conservation. La réalisation du prélèvement se fait selon les étapes suivantes :

- Recueillir l'échantillon en utilisant un dispositif : balai, brosse ou spatule à tête détachable.
- Déposer la tête détachable dans un flacon contenant un milieu préservateur à base d'éthanol.
- Placer le bouchon sur le flacon et serrer.
- Envoyer le flacon au laboratoire.

Echantillons respiratoires

Les échantillons respiratoires comprennent les expectorations, les brossages bronchiques, les lavages broncho-alvéoles [16].

Échantillon d'expectoration

Les crachats du matin sont recueillis dans un récipient à large ouverture. Aucun fixateur n'est nécessaire.

Brossage bronchique

La lésion est visualisée par une bronchoscope et le frottis est immédiatement étalé sur la lame, séché à l'air et fixé à l'alcool [16].

Lavage bronchique

La lésion est visualisée par une bronchoscope. Un volume de 5 ml de sérum physiologique est injecté. La solution est aspirée et envoyée immédiatement au laboratoire.

Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Une bronchoscope à fibre optique est introduit sous anesthésie locale dans un sous-segment bronchique sélectionné. Un volume de 20 ml de sérum salé est injecté, puis la solution de lavage est récupérée. Cette procédure est répétée quatre à cinq fois. Une solution globale de 40 à 50 ml est obtenue. Le liquide LBA est immédiatement envoyé au laboratoire.

Echantillons urinaires [16]

Urine vidée

Elle est préférable pour la cytologie de routine. On collecte la deuxième urine évacuée dans un récipient propre sans fixateur. Le prélèvement est envoyé immédiatement au laboratoire.

Lavage de la vessie

A l'aide d'un cathéter ou un cystoscope, on lave la vessie avec 50 à 100 ml de sérum physiologique. L'échantillon est récupéré et envoyé immédiatement au laboratoire sans aucun conservateur.

Urine urétérale

L'urine est collectée de chaque uretère par cathéter séparé après avoir gratter la lésion.

Échantillon de liquide d'épanchement

Le liquide d'épanchement frais recueilli dans un récipient sans fixateur. Il est nécessaire pour empêcher la coagulation de rajouter un ratio de 1/9 d'Ammonium. En cas de retard de traitement, il faut rajouter au mélange, un volume égal à celui du prélèvement, d'alcool éthylique à 50 %.

Aspiration par aiguille fine

La cytoponction est une technique de prélèvement réalisée après désinfection cutanée avec une aiguille fine, le plus souvent de 0,6 mm de diamètre (23 gauges) avec ou sans aspiration selon que la lésion est palpable ou non.

Le produit de cytoponction obtenu est délicatement projeté à l'aide d'une seringue sur des lames à raison d'une goutte par lame, jusqu'à son épuisement puis étalée.

Il peut s'agir de cytoponction de la thyroïde ou des organes pleins.

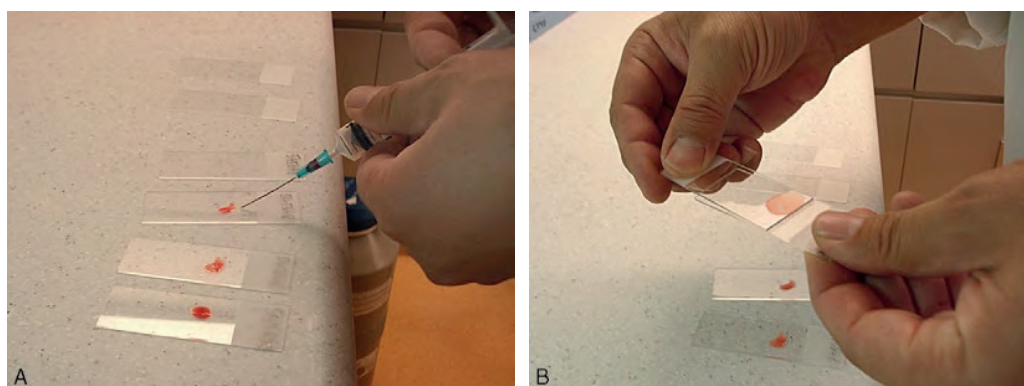


Figure 16 : Étalement manuel d'un produit de cytoponction.

(Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie Théorie et pratique, Véronique Marck
Laboratoire de pathologie Institut Curie, Paris,2009.)

Autres prélèvements

Le grattage des cellules et étalement du produit sur une lame. Le plus fréquemment réalisé est le grattage d'une lésion cutanée après ablation des croûtes et le grattage mamelonnaire qui est réalisé pour rechercher une maladie de Paget [17].

Fixation

Le principe de la fixation d'un matériel cytologique est de conserver les cellules dans un état aussi proche de l'état biologique en réduisant l'autolyse et en précipitant les protéines contenues dans le cytoplasme. En règle générale, les solutions commercialisées contiennent un fixateur alcoolique (éthanol ou méthanol) à des concentrations variables avec des additifs tels que des agents hémolytiques et/ou mucolytiques pour empêcher la formation de fibrine, de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) pour dissocier les amas cellulaires et du polyéthylène glycol pour diminuer la rétraction cytoplasmique.

Le temps de fixation recommandé par les différentes firmes doit être suffisant en fonction du type de prélèvement.

Ce qui permet d'avoir au niveau des cellules une résistance au niveau de leur membrane cytoplasmique et nucléaire pour subir des contraintes mécaniques telles que l'agitation ou le dépôt sur lame [17].

Cytopréparation des prélèvements

Prélèvements gynécologiques

Technique conventionnelle

Préparation des lames

À l'aide d'un crayon (qui ne s'effacera pas lors de la coloration de la lame), il faut identifier la lame en y inscrivant l'identifiant numérique univoque de la patiente.

Aucune préparation n'est requise pour ce type de spécimen. Les spécimens sont déjà étalés, il faut fixer les lames avec l'alcool absolu pendant quelques minutes et réaliser la coloration de Papanicolaou [7].

Avantages et inconvénients

Les avantages de la cytologie conventionnelle résident en un coût unitaire peu élevé ainsi qu'une utilisation très répandue. Par contre, celle-ci nécessite une dextérité importante de la part du personnel clinique pour produire une lamelle adéquate qui se prêtera bien à la lecture par microscope. Notons enfin qu'un pourcentage de cellules se retrouvent à la poubelle avec la spatule ou la brosse cervicale et que la présence de sang ou de mucus sur la lamelle peut nuire à sa lecture [18].

Frottis cervico-vaginal en milieu liquide

Préparation des lames :

La préparation des lames nécessite les étapes suivantes :

- Homogénéiser / vortexer le flacon pendant 10 secondes
- Déposer 2 ml de suspension cellulaire dans une chambre cytofunnel
- Ajouter 2 ml de conservateur
- Cytocentrifuger à 1250 tours/min pendant 5 minutes à haute accélération
- Récupérer la lame et retirer la chambre cytofunnel
- Laisser la lame sécher à l'air brièvement
- Immerger la lame dans l'alcool 95% pendant au moins 10 minutes
- Réaliser la coloration de Papanicolaou

Avantages et inconvénients :

L'avantage essentiel du choix de la cytologie en milieu liquide est l'absence de défauts d'étalement et de fixation. Elle permet une meilleure collecte des cellules et une préparation plus uniforme des lames. Elle réduit le nombre de frottis ininterprétables. La cytologie en milieu liquide facilite l'interprétation et permet un gain de temps de lecture. Un autre avantage est la possibilité de faire des tests HPV à partir des cellules provenant de la préparation ayant servi à la confection des lames.

Prélèvements non gynécologiques

Les techniques de traitements des prélèvements non gynécologiques les plus répandues sont :

- Frottis direct
- Centrifugation
- Cytocentrifugation
- Technique millipore
- Bloc de cellule

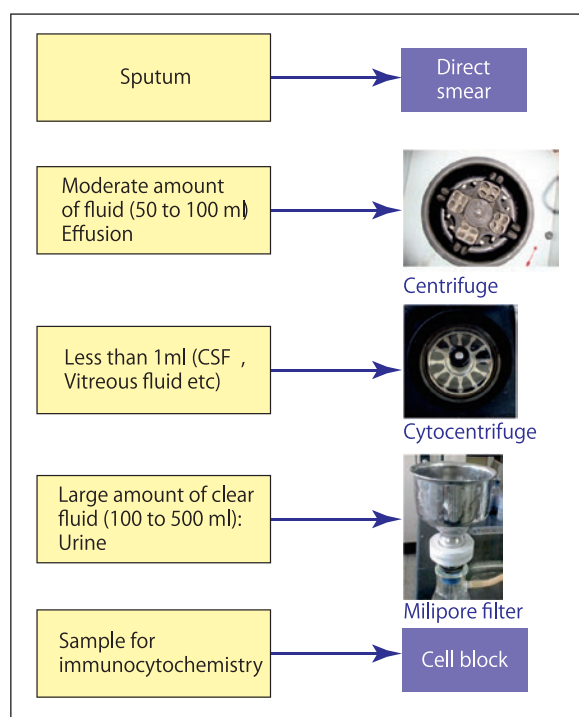


Figure 17 : Principales techniques de traitements des prélèvements cytologiques non gynécologiques
(Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology, Pranab Dey, 2017.)

Prélèvements d'expectorations. Les étalements doivent être réalisés sur des lames propres et sèches sans trace d'empreintes digitales. La qualité des étalements conditionne la qualité de l'étude morphologique. Les frottis hémorragiques, trop épais ainsi que les superpositions cellulaires peuvent gêner l'interprétation microscopique [17].

La préparation des lames nécessite les étapes suivantes :

- Verser l'échantillon d'expectoration dans une boîte de Pétri à fond noir
- Examiner soigneusement
- Ramasser les fragments de tissus par un forceps
- Préparez les frottis sur la lame de verre propre
- Colorer les lames à la coloration de Papanicolaou

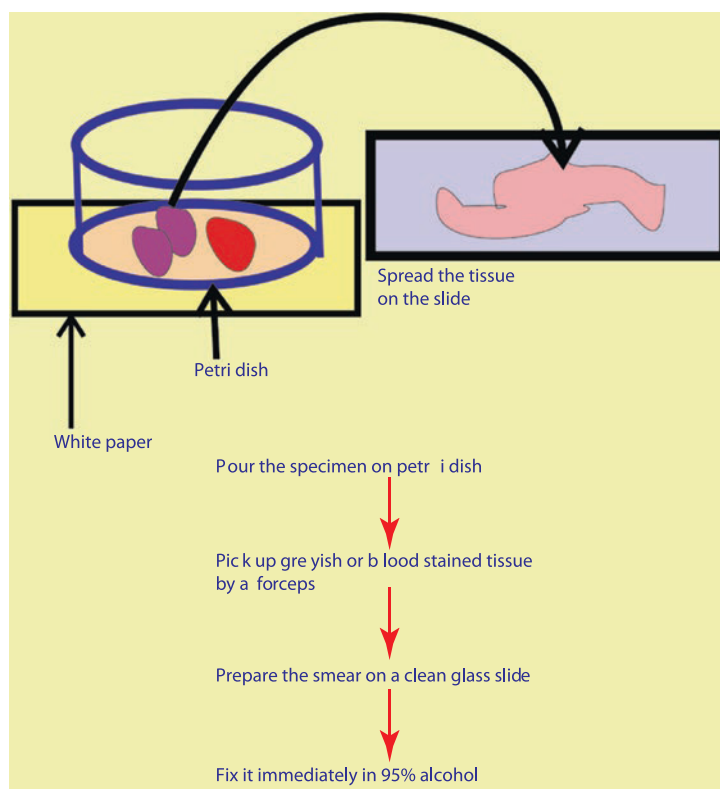


Figure 18 : Frottis direct traitement des expectorations.
(Basic and Advanced Laboratory Techniques in
Histopathology and Cytology, Pranab Dey, 2017.)

Centrifugation

Centrifugation (Figure 19)

La centrifugation est une technique utilisée dans la cytopréparation des urines, fluides corporels et lavage ayant un volume modéré (50 à 100 ml).

La centrifugation est un système qui utilise la force centrifuge pour séparer les constituants de masses volumiques différentes, les plus lourds s'accumulant au fond du tube formant ainsi le culot. Dans certains cas, les éléments cellulaires sont plus légers que les hématies et forment une sorte d'anneau rosé ou blanchâtre entre le culot hématique et le surnageant.

Le liquide placé dans un tube bouché (conique en matière plastique) est déposé dans une des nacelles de la centrifugeuse qui doit être équilibrée avec un tube identique contenant le même volume. Dans une enceinte fermée, le liquide subit une rotation dont la vitesse et le temps sont prédéfinis en fonction du matériel (2500t/min pendant 5 minutes pour une ascite, un kyste ou un liquide pleural). À la fin du programme, le surnageant est éliminé et le culot obtenu récupéré à l'aide d'une pipette automatique afin de réaliser des étalements manuels et/ou en couche mince.

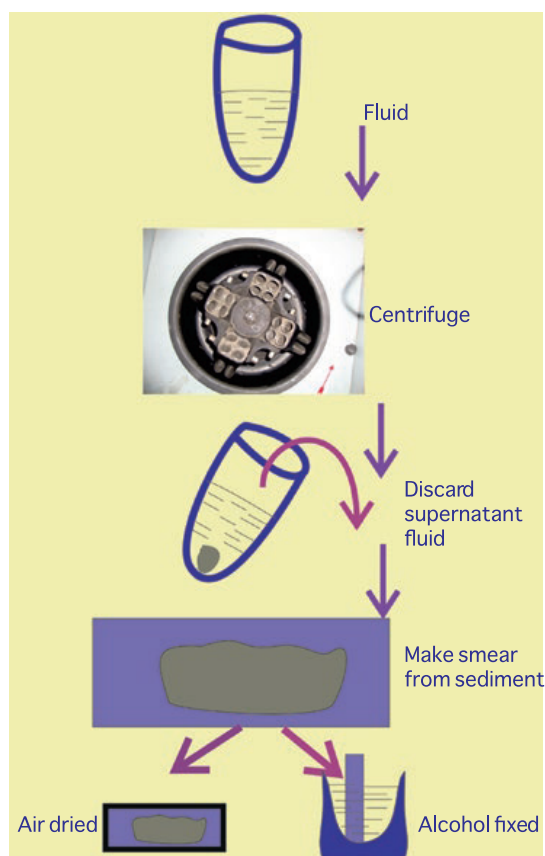


Figure 19 : Cytopréparation des liquides par centrifugation
(Basic and Advanced Laboratory Techniques in
Histopathology and Cytology, Pranab Dey, 2017.)

Lavage broncho-alvéolaire

Le LBA est réalisé lors d'une fibroscopie dans le segment pulmonaire sélectionné. 100 à 300 ml de solution saline à température ambiante sont injectés par le fibroscope puis immédiatement réaspiré avec une pression douce afin d'éviter le collapsus des voies respiratoires.

Acheminement

Le liquide doit être collecté dans un contenant ne permettant pas l'adhésion des cellules (verre siliconé, polypropylène ou autres plastiques prévus à cet effet).

Si le temps de transport jusqu'au laboratoire est inférieur à 30 minutes, ce dernier peut être conservé à température ambiante, s'il est estimé entre 30 et 60 minutes, il doit être conservé à 4 °C.

Si le temps de transport est supérieur, il est conseillé de centrifuger les cellules et de les mettre en suspension dans un milieu nutritif de type RPMI (à 4 °C), ce qui permet de les conserver pendant 24 h.

Si la centrifugation n'est pas possible, il est recommandé d'ajouter du milieu nutritif dans le liquide de lavage et de le stocker à 4 °C ce qui permet une conservation pendant 12 h. Les LBA ne doivent pas être congelés ou transportés dans la glace.

Examen macroscopique et prise en charge du LBA en technique

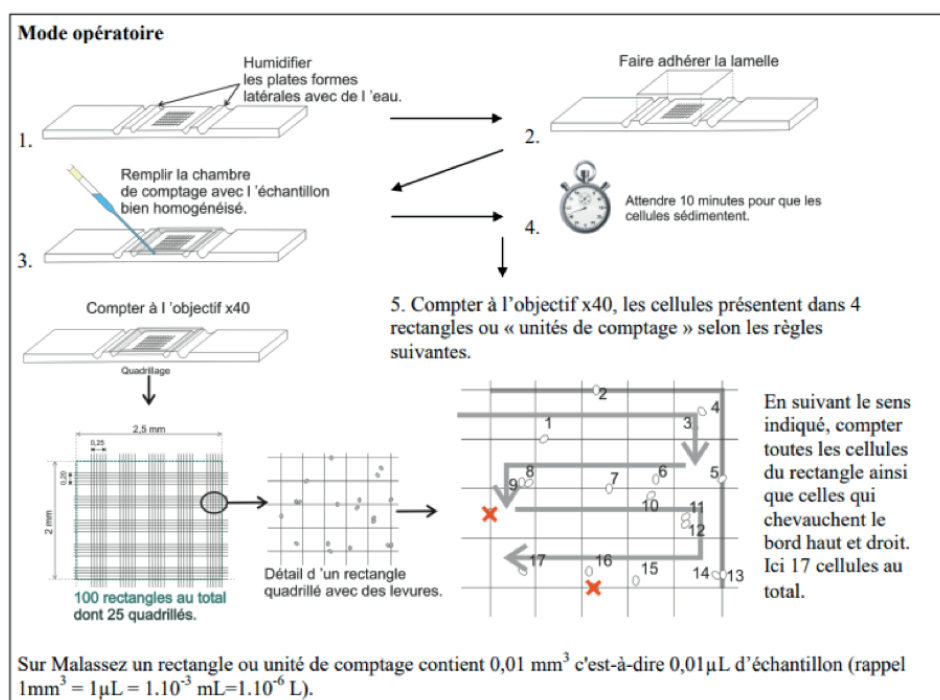
Une prise en charge rapide du liquide permet des résultats optimaux.

Le technicien évalue l'aspect macroscopique (clair, trouble muqueux, laiteux, hémorragique).

- La quantité de mucus est très importante, il est possible de filtrer le fluide à travers une compresse de gaze (hors contexte néoplasique).

- Le volume reçu est indiqué.

- Le compte des cellules : le compte total des cellules est effectué sur cellules de Malassez et rapporté en nombre de cellules par ml et la viabilité cellulaire est obtenue par test d'exclusion au bleu Trypan. La technique de dénombrement de Malassez se fait, selon le protocole indiqué dans le schéma ci-dessous.



Calculs
Formule à appliquer :

Nombre de cellules par unité de volume Nombre de cellules comptées Facteur de dilution

Nombre d'unités de comptage dénombrées $N = \frac{n}{a.v} \times Fd$ nombre de cellules par unité de volume Volume d'une unité de comptage

Exemple d'application :
Soit une suspension de levures diluée 1000 fois et dénombrée en cellule de Malassez. Le dénombrement de 4 rectangles donne les résultats suivant 17, 22, 15, et 20 cellules pour chaque unité de comptage (rectangle). Le volume d'une sous unité est $0,01 \text{ mm}^3$, si on veut le résultat en cellules/mL il faudra convertir le volume de l'unité de comptage en mL soit $0,01.10^{-3} \text{ mL}$.

Concentration = $\frac{N}{a.v} \times Fd = \frac{(17 + 22 + 15 + 20)}{4 \times 0,01.10^{-3}} \times 1000 = \frac{74}{4 \times 0,01.10^{-3}} \times 1000 = 1,89.10^9 \text{ cellules / mL}$

Figure 20 : Protocole de prise en charge macroscopique du LBA : liquide broncho-alvéolaire

- La cytocentrifugation du liquide, se fait sur 8 lames et on pratique systématiquement : 2 May-Grunwald-Giemsa (MGG, idéalement en automate), 1 Papanicolaou, 1 Perls, 1 PAS.

Le score de Golde

Dès que des sidérophages sont identifiés, il conviendra de pratiquer un score de Golde pour la recherche d'une hémorragie intra-alvéolaire (HIA) occulte.

Ce score est calculé sur 200 macrophages au grossissement 40 ou 50 et ramené à un pourcentage pour chacun des scores. Chaque macrophage possède un score de 0 à 4, et le score est calculé en multipliant pour chacun des scores, le pourcentage de cellules possédant ce score. Ainsi, s'il y a 60 % de sidérophages (donc 40 % de macrophages de score 0) comprenant 20 % de score 1, et 40 % de score 3, le score de Golde sera de $20 \times 1 + 40 \times 3$, soit de 140. Le score s'étend ainsi de 0 à 400 si tous les macrophages sont de score 4 (0 : pas de dépôts hémossidériniques ; 1 : cytoplasme bleu pâle, pas de granulation ; 2 : cytoplasme bleu modéré diffus ou avec quelques granulations sur moins de 50 % de la surface ; 3 : cytoplasme bleu foncé diffus ou granulations sur plus de 50 % de la surface avec noyau bien visible ; 4 : forte positivité masquant le noyau). Un score de 100 signe une hémorragie alvéolaire et un score entre 50 et 100 correspond à une sidérose.

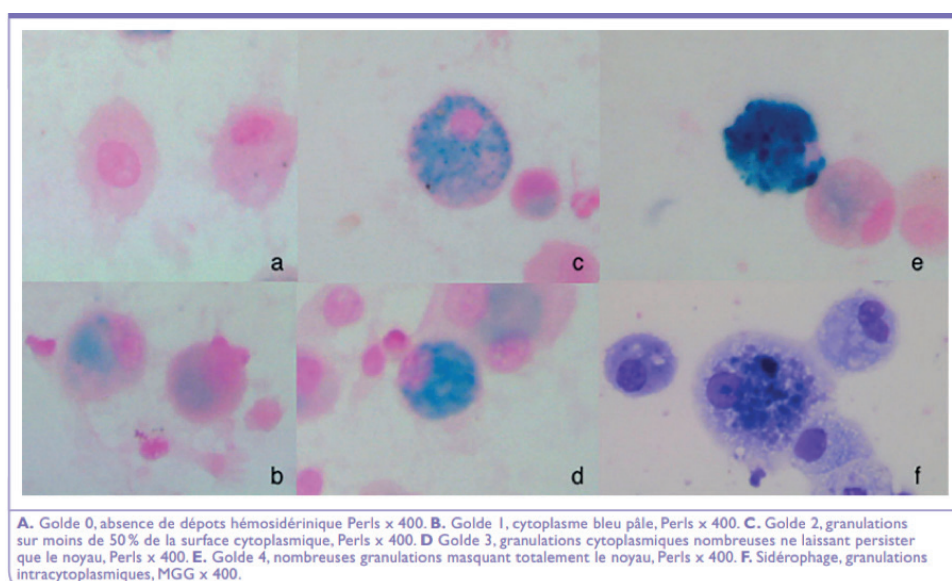


Figure 21 : Illustration du score de Golde dans le LBA

Coloration de Ziehl Nielsen en fonction du contexte clinique

Faire un culot de centrifugation du liquide restant et le resuspendre en RPMI à 4 °C pour 24 heures. En fonction des données de cytologie sur étalement, une inclusion du culot en paraffine pourra être décidée le lendemain.

Des techniques complémentaires peuvent être réalisées sur le liquide telles que l'analyse par cytométrie en flux des populations lymphocytaires CD4+ et CD8+ ou d'autres populations lymphocytaires en cas de suspicion de lymphome, des analyses biochimiques, des analyses minéralogiques, ou des analyses moléculaires (clonalité, PCR en infectiologie...). [19]

Cytocentrifugation

La cytocentrifugation est une technique qui utilise la force centrifuge (dans une enceinte fermée) pour déposer les cellules en couche mince et homogène dans une zone bien définie d'une lame tout en préservant l'intégrité cellulaire. La force centrifuge provoque le basculement, les cellules sont déposées sur la lame tandis que le surnageant est absorbé par le filtre. En fait, pendant le fonctionnement, les cellules sont projetées sur la lame perpendiculairement à l'axe de rotation formant ainsi un disque de 0,5mm tandis que le surnageant en excès est absorbé par le filtre. Cette technique est principalement utilisée pour les suspensions peu abondantes et/ou pauci-cellulaires. La vitesse et le temps peuvent être programmés en fonction du matériel (700t/min pendant 5 minutes pour le LCR par exemple). [17]

Technique millipore (Figure 22)

La technique de filtration Millipore est la technique de référence pour traiter une grande quantité d'échantillon comme par exemple les urines.

La préparation des lames nécessite les étapes suivantes :

- Mettre le papier filtre Millipore humidifié avec une solution saline sur le tamis.
- Fixer la coupelle du filtre.
- Mettre l'échantillon dans la coupelle du filtre.
- Démarrer le processus d'aspiration.
- Le liquide est drainé dans la bouteille laissant les cellules sur le papier filtre.
- Réaliser plusieurs frottis d'empreinte sur des lames recouvertes d'albumine.
- Fixer les lames par l'alcool 95% pendant 30 min.
- Colorer les lames à la coloration de Papanicolaou.

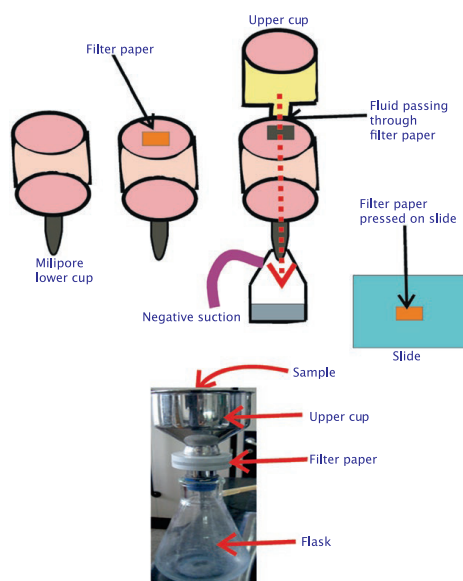


Figure 22 : Cytoprélaboration des urines par la technique millipore. (Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology, Pranab Dey, 2017)

Cyto bloc

La création d'un bloc cellulaire est une alternative utile pour le diagnostic de certaines lésions (métastase, tumeur rare ou maligne). Cette méthode permet d'enrober, dans un gel, un produit de cytoponction, le culot de centrifugation d'un liquide ou des microfragments tissulaires, afin de réaliser des coupes sériées pour coloration par l'HES, ou permettre la réalisation de réserve de cellules fixées en vue de techniques spéciales (colorations spéciales, immuno-histochimique, immunofluorescence et biologie moléculaire). [17]

Pour réaliser la préparation du cytobloc, il faut :

- Centrifuger le prélèvement.
- Ajouter la solution CytoRich (destinée pour les prélèvements hémolysés et la fixation douce des cellules) dans un rapport 1:1 au sédiment.
- Garder-le pendant 2 min.
- Ajouter quatre gouttes de plasma et trois gouttes de thrombine (5000 UI/ml).
- Agiter doucement le mélange pour former un caillot.
- Transférer le caillot dans un papier filtre.
- Fixer-le dans formol.
- Traiter le caillot dans le processeur de tissus.

Colorations cytologiques [7]

Coloration Papanicolaou :

Réactifs

- Hématéine.
- Papanicolaou OG-6 (prêt à l'emploi).
- Papanicolaou EA50 (prêt à l'emploi).

Mode opératoire

- Fixer les lames avec l'alcool absolu.
- Plonger 5 fois dans l'alcool à 95%.
- Plonger 5 fois dans l'alcool à 70%.
- Laver à l'eau courante.
- Laver à l'eau distillée.
- Colorer à l'hématéine pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau courante.
- Rincer à l'eau distillée.
- Plonger 5 fois dans l'alcool à 70%.
- Laver à l'eau courante.
- Laver à l'eau distillée.
- Plonger 5 fois dans l'alcool à 95%.
- Colorer à l'OG-6 pendant 4 minutes 30 secondes.
- Plonger dans l'alcool à 95%.
- Colorer par EA50 pendant 5 minutes.
- Plonger dans l'alcool absolu.
- Déshydrater les lames dans 3 bains d'éthanol absolu (3x5min).
- Eclaircir les lames dans 3 bains de toluène (3x5min).
- Faire le montage.

Résultats

- Noyauxbleu.
- Cytoplasmes des cellules profondes.....teinte vert-bleu.
- Cytoplasmes des cellules superficielles.....teinte rose.

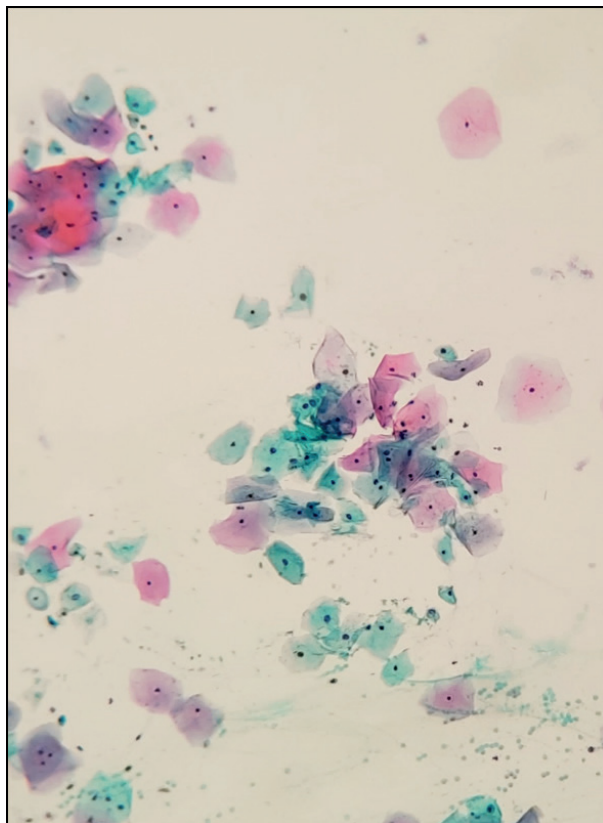


Figure 23 : Frottis cervico-utérin montrant des cellules superficielles et intermédiaires (Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique C.H.U TTA)

Coloration de MGG

Réactifs

- Giemsa
- May Grunwald

Mode opératoire

- Fixer les lames avec l'alcool absolu.
- Plonger 5 fois dans l'alcool à 95%.
- Plonger 5 fois dans l'alcool à 70%.
- Rincer à l'eau courante puis à l'eau distillée.
- Mettre le MG pur pendant 7 min.
- Rincer à l'eau courante puis à l'eau distillée.
- Mettre les lames dans le carbonate de lithium pendant 40 secondes
- Rincer la lame avec l'eau courante puis à l'eau distillée.
- Mettre le Giemsa dilué au 1/10 pendant 25min
- Rincer avec l'eau courante
- Déshydrater (3bains d'alcool)
- Éclaircir (3bains de toluène)
- Monter par la colle

Résultats :

- Les noyaux bleu à violet-noir
- Les hématies beige-rosé

Comparaison entre des colorations de Papanicolaou et MGG

Tableau 2 : Comparaison entre les colorations de Papanicolaou et MGG [16]

Caractéristiques	Papanicolaou	MGG
Détail nucléaire	Excellent pour la coloration de chromatine	Le motif de la chromatine ne peut pas être étudié
Démonstration de kératine	L'orange G colore la kératine en orange vif	Ne peut pas être démontré
Métachromasie	Pas de coloration métachromatique	Coloration métachromatique
Mucine de fond ou nécrose	Pas bon	Bon pour la démonstration de substances extracellulaires



Chapitre 4

Colorations spéciales

- KHARMOUM Jinane
- EL JIAR Mohammed
- EL OUARDI Kaoutar
- CHRAÏBI Mariame

Les colorations spéciales visent à mettre en évidence les constituants cellulaires particuliers à partir de leurs compositions chimiques et affinités tinctoriales. Il peut s'agir de :

- constituants particuliers des cellules (glycogène, mucus, pigment...)
- matrice extra cellulaire (collagène, fibre élastique, amylose...)
- agents infectieux (bactéries, parasites, champignons).

Coloration PAS

Principe

La coloration PAS (Periodic Acid Schiff) met en évidence les mucines (épithélium à bordures en brosse), les membranes basales, le glycogène ainsi que les filaments et spores mycéliens. La réaction à l'acide périodique de Schiff correspond à l'oxydation de certains polysaccharides par l'acide périodique, révélée par une coloration rouge (fixation de la leucofuch sine de Schiff). [19]

Technique

Réactifs

- Acide périodique à 1%
- Réactif de Schiff
- L'hématoxyline

Mode opératoire [7]

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Rincer à l'eau distillée
- Rincer à l'eau courante
- Mettre l'acide périodique pendant 10min
- Rincer à l'eau courante
- Rincer à l'eau distillée
- Sécher les lames sur une plaque chauffante.
- Mettre le réactif du Schiff pendant 35 à 45 min
- Rincer à l'eau distillée
- Rincer à l'eau courante
- Contre coloration à l'hématoxyline pendant 3min
- Rincer à l'eau courante
- Rincer à l'eau distillée
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats [11]

- Mucopolysaccharides acides.....rouge-violacé

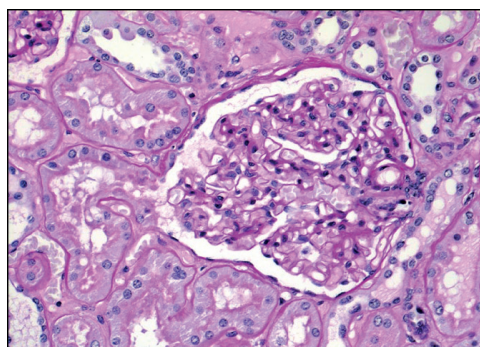


Figure 24 : Glomérule rénal montrant une coloration de la membrane basale par le PAS <https://pathorama.ch/pathopic/003443/show>

- Témoin : peau (membrane basale).

Coloration de Trichrome de Masson

Principe

C'est une coloration mettant en évidence les fibres de collagène, les fibres réticulaires, et les fibres musculaires. [12]

Technique

Réactifs

- Hémalun de Mayer
- Fuschine ponceau
- Eau acétique à 1%
- Acide phosphmolybdique
- Bleu d'aniline

Mode opératoire [7] [11]

- Déparaffinage (3 bains de toluène).
- Hydratation (3 bains d'alcool).
- Colorer les lames dans l'hémalun de Mayer pendant 10 minutes.
- Rincer les lames dans un bain d'eau courante pendant 4 minutes.
- Colorer les lames dans la fuschine ponceau pendant 5 minutes.
- Rincer les lames dans deux bains d'eau acétique à 1%.
- Plonger les lames dans l'acide phosphmolybdique pendant 3 minutes.
- Sans rincer, colorer les lames dans le bleu d'aniline pendant 5 minutes.
- Rincer les lames dans deux bains d'eau acétique à 1%.
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats [11]

- Noyaux : bleu noir ou bruns
- Cytoplasme : rouge
- Globules rouges : rouge
- Collagène : Bleu
- Mucus : bleu
- Kératine : rouge vif
- Lames élastiques : rose

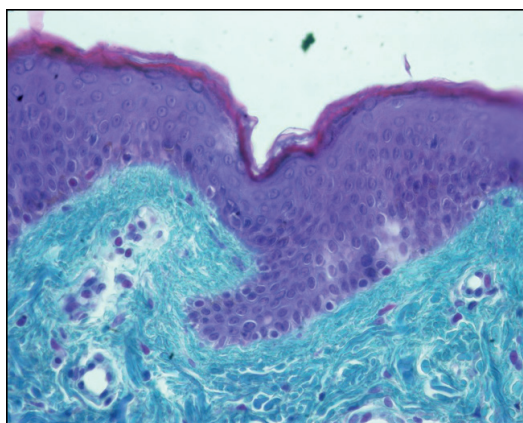


Figure 25 : Trichrome montrant une coloration en bleu du collagène du derme (<https://www.flickr.com/photos/bioalternatives/9149742119>)

Coloration bleu Alcian

Principe

La Coloration de bleu alcian permet de visualiser des mucopolysaccharides carboxylés par fixation électrostatique du Bleu Alcian à pH acide voisin de 2,6. [20]

Technique :

Réactifs

- Bleu alcian à 1%
- Eosine

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Rincer à l'eau courante
- Mettre le Bleu Alcian pendant 30min
- Rincer à l'eau courante
- Faire une contre coloration avec l'éosine
- Rincer à l'eau courante
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats

- Mucopolysaccharides faiblement acides..... Bleu
- Noyaux.....Bleu
- GlycogèneRose intense

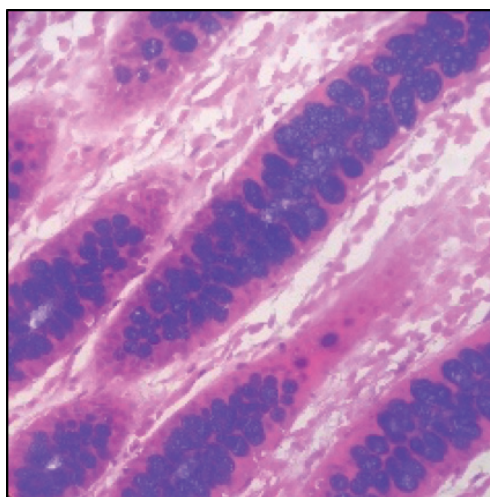


Figure 26 : Coloration bleuâtre du mucine des cellules épithéliales caliciformes coliques
(Laboratoire d'ACP CHU TTA)

Coloration bleu de toluidine [21]

Principe

Le bleu de toluidine est un colorant non spécifique, basique et il a donc une bonne affinité pour les structures acides comme les acides nucléiques. Il peut colorer les structures en leur donnant sa couleur ou en leur donnant une couleur différente, par exemple les polysaccharides en rouge, les polyphénols en vert turquoise.

Technique :

Réactifs

- Bleu de toluidine à 0,2%

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Réhydratation (3 bains d'eau)
- Mettre le Bleu de toluidine pdt 1min
- Rincer à l'eau courante
- Différencier en mettant les lames dans l'alcool 70°
- Rincer à l'eau courante
- Rincer à l'eau distillée
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats

- Cytoplasme : bleu
- Chromatine : bleu clair
- Nucléole : bleu foncé

Coloration Rouge Congo

Principe [22]

Cette coloration a une affinité particulière pour les protéines de configuration B-plissées comme l'amylose. L'amylose est colorée en rouge et exprime une double réfringence vert pomme lorsqu'on l'observe en lumière polarisée.

Technique [7]

Réactifs

- Hémalun
- Rouge congo

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Rincer à l'eau distillée
- Mettre les lames l'Hémalun pendant 5-10min
- Rincer à l'eau courante
- Mettre les lames dans le carbonate de lithium
- Rincer à l'eau courante
- Mettre les lames dans le Rouge Congo pendant 20min
- Rincer à l'eau courante
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats

- Noyaux : bleus.
- Amyloïde en lumière transmise : rose à rouge.
- Amyloïde en lumière polarisée : métachromasie verte.
- Tissus conjonctifs, collagène : rouge clair.

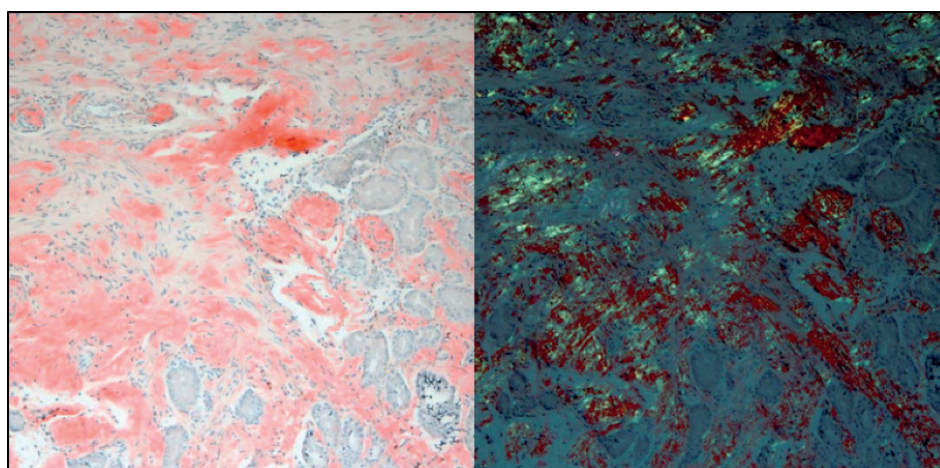


Figure 27 : Coloration rouge Congo mettant en évidence des dépôts amyloïdes en rouge brique avec coloration en vert pomme sous lumière polarisée.

Coloration de Perls [7] [11]

Principe

Cette coloration permet de mettre évidence les dépôts ferriques dans les tissus.

Technique

Réactifs

- Ferrocyanure de potassium
- Acide chlorhydrique pur
- L'éosine

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Rincer à l'eau courante
- Mettre les lames dans le mélange préparé au moment de la technique (S1-S2)
- S1 : Ferrocyanure de potassium (0,2g dans 10ml d'eau distillée)
- S2 : Acide chlorhydrique (200ul dans 10ml d'eau distillée)
- Laisser les lames 20 min
- Rincer
- Contrer colorer à l'éosine
- Rincer à l'eau courante
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats

- Sels ferriques (Hémosidérine).....Bleu
- Noyaux et cytoplasme.....Rosé

Remarque

Ne jamais utiliser de pinces ou de supports métalliques pour cette coloration.

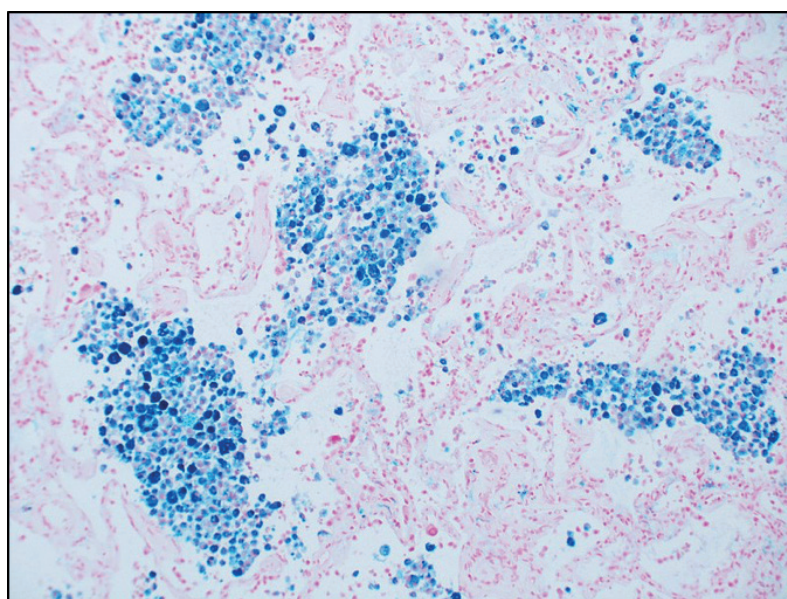


Figure 28 Coloration de Perls montrant des dépôts d'hémosidérine en intra-alvéolaire (https://www.flickr.com/photos/pulmonary_pathology/3626657617/)

Coloration de Ziehl

Principe [23]

C'est une coloration différentielle qui permet d'identifier les mycobactéries notamment *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose et *M. leprae* responsable de la lèpre. Elle permet de mettre en évidence l'acido-alcool-résistance des mycobactéries. En effet, le peptidoglycane des mycobactéries porte des acides mycoliques qui empêchent la décoloration des cellules par le mélange acide/alcool.

Technique

Réactifs

- Fuchsine phéniquée de Ziehl
- Bleu de méthylène

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Rincer à l'eau courante
- Mettre les lames dans le carbonate de lithium
- Rincer à l'eau courante
- Mettre la Fuchsine phéniquée de Ziehl pendant 20min
- Différencier à l'alcool-Acide à 3% (rapidement sous l'eau : la coupe devient pourpre)
- Contre colorer avec le bleu de méthylène pendant 10min
- Rincer à l'eau distillée
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats [24]

- Bacilles acido-alcool-résistants.....rouge
- Fond.....Bleu-vert pale

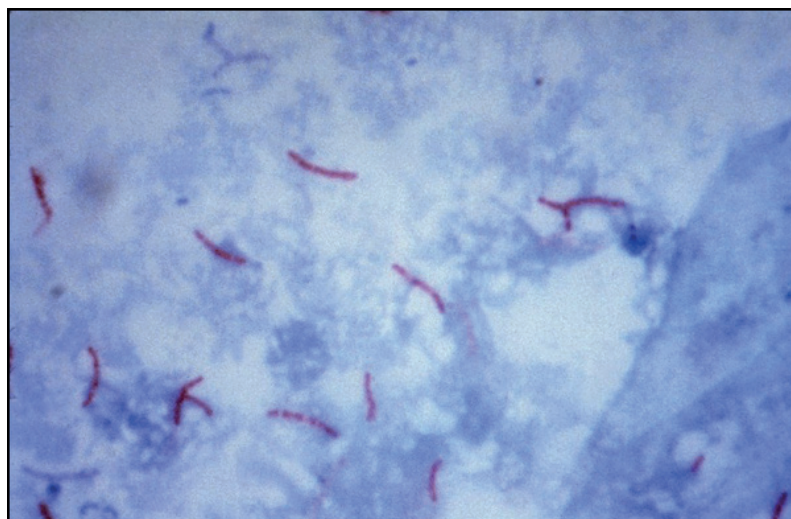


Figure 29 Bacilles acido-alcool-résistants (phil.cdc.gov CDC-PHIL ID #5789)

Coloration rouge Sirius

Principe [13]

Le Rouge Sirius se fixe de façon empirique sur les fibres de collagène et de réticuline.

Technique [11]

Réactifs

- Picrosirius :
 - Rouge sirius0,1g
 - Acide picrique en solution saturée..... 100ml
- Hématoxyline de Harris

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation à l'alcool
- Plonger dans l'eau courante
- Plonger dans Hématoxyline de Harris (1min)
- Rinçage à l'eau courante (2min)
- Rinçage à l'eau distillée
- Plonger dans la solution de Picrosirius (120min)
- Lavage à l'eau courante (10min)
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultat

- Amylose : rouge
- Polynucléaires éosinophiles : rouge
- Les fibres : rouges

L'orcéine [20]

Principe

L'orcéine est un colorant acide faible qui se fixe avec une grande électivité sur les fibres et lames élastiques.-

Technique

Réactifs

- ORCEINE :
 - Orcéine : 1 g
 - Ethanol à 70% : 100 ml
 - HCl concentré (d =1,19) : 0,6 ml
- ACIDE/ALCOOL :
 - HCl concentré à 1% dans l'alcool éthylique à 70°
- ROUGE NUCLEAIRE OU KERNERCHTROT :
 - Poudre de rouge nucléaire : 2 g
 - Sulfate d'aluminium : 50 g
 - Eau distillée : 1000 ml
 - Dissoudre le sulfate d'aluminium dans l'eau distillée, jusqu'au bouillonnement
 - Attendre environ 5min avant d'ajouter le rouge nucléaire Agiter doucement : le liquide devient trouble
 - Remettre à chauffer jusqu'à éclaircissement de la solution sans faire bouillir.
 - Laisser refroidir. Filtrer et Conserver à 4°C (1 mois).

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Colorer à l'Orcéine pendant 30 à 60 min
- Rincer à l'eau courante.
- Plonger les lames dans un bain d'alcool absolu (les coupes deviennent brunes) pendant 10 minutes.

Contrôler au microscope : les fibres élastiques sont brunes sur fond beige

- Plonger les lames dans un bain d'alcool/acide (les coupes deviennent roses) pendant 2 à 10 minutes

Contrôler au microscope : les fibres élastiques sont brun-acajou sur fond rose

- Rincer à l'eau courante pendant au moins pendant 5 min.
- Contre colorer les coupes dans le bain de rouge nucléaire pendant 5 minutes
- Rincer à l'eau courant puis à l'eau distillée.
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultat

- Fibres élastiques : brun acajou
- Noyaux et cytoplasmes : rouge à rose

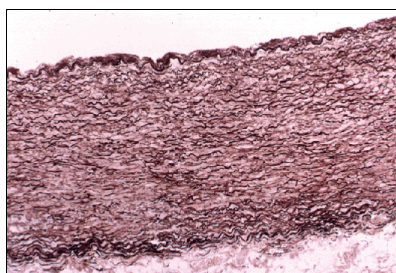


Figure 30 Coloration par orcéine des fibres élastiques d'une paroi artérielle
(<http://education.med.nyu.edu/Histology/courseware/modules/stains/stains8.html>)

Coloration MGG

Principe

Sur des préparations fixées par dessiccation rapide, la, mettant particulièrement en évidence le caractère basique ou acide des cytoplasmes et les granulations des leucocytes.

Technique [7]

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Rinçage à l'eau courante
- Mettre le MG pur pendant 5min
- Rincer à l'eau courante
- Tremper les lames dans le carbonate de lithium
- Rincer la lame avec l'eau de robinet pendant 1min
- Mettre le Giemsa dilué au 1/10 pendant 20min
- Rincer avec l'eau de robinet
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats

- Les noyauxbleu à violet-noir
- Les hématies beige-rosé

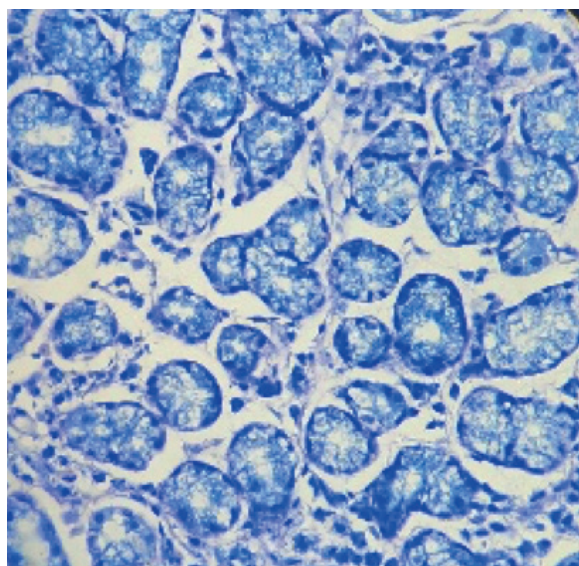


Figure 31 : Coupe histologique montrant une coloration MGG (Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologique CHU TTA)

Coloration de réticuline :

Principe [25]

Les fibres de réticuline sont argyrophiles et se colorent de ce fait en noir après oxydation par imprégnation argentique.

Technique [13]

Réactifs

- Permanganate sulfurique
 - Permanganate de potassium à 0,5% : 47,5 ml
 - Acide sulfurique à 3 % : 2,5 ml
 - Acide oxalique à 1%
 - Alun de fer à 2,5%
- Nitrate d'argent ammoniacal
 - Ajouter, à 5 ml de nitrate d'argent à 10%, l'ammoniaque concentré goutte à goutte. Un précipité noir apparaît instantanément qui se dissout par l'ajout des gouttes d'ammoniac
 - Ajouter 5 ml d'hydroxyde de sodium à 3%. Un nouveau précipité noir apparaît instantanément à dissoudre par l'ajout des gouttes d'ammoniac.
 - Compléter à 50 ml avec de l'eau distillée.
 - Conserver cette solution à l'abri de la lumière, à 4°C, maximum 5 jours.
- Formaldéhyde à 10% fraîchement préparé.
- Chlorure d'or à 0, 2%
 - Chlorure d'or : 0,2g
 - Eau distillée : 100ml
- Thiosulfate de sodium à 5% (hyposulfite de sodium)
 - Thiosulfate de sodium : 5g
 - Eau distillée : 100ml
- Kernechtrot (Rouge nucléaire, rouge neutre) Stockage à +4°C
 - Kernechtrot0,2g
 - Sulfate d'aluminium5g
 - Eau distillée100ml
 Dissoudre en chauffant, refroidir, filtrer, conserver à +4°C

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Plonger dans la solution de permanganate sulfurique pendant 5 min
- Rincer à l'eau courante
- Plonger la lame dans l'acide oxalique (coupes devenant blanches)
- Rincer à l'eau courante
- Plonger dans l'alun de fer pendant 15 min
- Rincer à l'eau courante
- Rincer à l'eau distillée 1 bain
- Plonger dans le nitrate d'argent ammoniacal pendant 30 s
- Rincer à l'eau distillée 3 bains
- Plonger la lame dans le formaldéhyde (coupes devenant noires instantanément)
- Rincer dans un bain d'eau distillée
- Plonger la lame dans le chlorure d'or pendant 3 min
- Rincer la lame à l'eau courante
- Plonger la lame dans l'hyposulfite de sodium pendant 5 min- Rincer à l'eau courante pendant 10 min
- Colorer au rouge nucléaire pendant 2 à 5 min
- Rincer à l'eau courante
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats

- Fibres de réticuline : noires
- Noyaux : rouges sur fond rose.

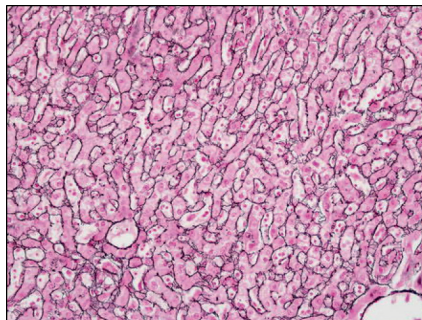


Figure 32 Coloration à la réticuline d'un parenchyme hépatique
(<https://abdominalkey.com/benign-hepatocellular-tumors/>)

Remarque

- Utiliser des produits chimiquement purs, de l'eau bidistillée et de la verrerie rigoureusement propre.
- Ne pas utiliser d'objet métallique.
- Stabiliser la solution de nitrate d'argent ammoniacal instable (formation d'un mélange explosif) avant son élimination par ajout de chlorure de sodium.

Coloration de GROCOTT

Principe

Cette coloration met en évidence les micro-organismes soit les levures ou champignons (*C. Albicans*) et parasites. Les glucides de la paroi des champignons sont transformés en aldéhydes par oxydation. Ces aldéhydes sont détectés par la réduction du complexe d'argent méthénamine.

Technique [13]

Réactifs

- Acide chromique à 5%
- Hyposulfite de sodium à 2%
- Bisulfite de sodium à 1 %
- Vert lumière : solution à 1% dans l'acide acétique à 1%
- Chlorure d'or à 0,1%
- Borax à 5%
- Solution mère :
 - Hexaméthylène-tetramine à 3% : 200ml
 - Nitrate d'argent à 5% : 10ml

Il se forme un précipité blanc qui se dissout immédiatement par agitation cette solution se conserve à +4°C pendant un mois

- Solution de travail
 - Solution mère : 84 ml
 - Eau distillée : 70 ml
 - Borax à 5% : 6 ml

Cette solution se prépare extemporanément et se préchauffe 1h à 56°C

Mode opératoire

- Déparaffinage (3 bains de toluène)
- Hydratation (3 bains d'alcool)
- Plonger dans un bain d'alcool à 80% en agitant pendant 2 min
- Réhydrater à l'eau courante puis à l'eau distillée.
- Colorer à l'acide chromique pendant 10 min
- Rincer à l'eau courante.
- Plonger dans le bisulfite de sodium (les coupes deviennent blanches).
- Rincer à l'eau courante.
- Rincer dans un bain d'eau distillée.
- Plonger dans un récipient fermé contenant la solution de travail à 56 °C pendant 1 h
- Arrêter la réaction lorsque les coupes deviennent brunâtres.
- Rincer dans 2 bains d'eau distillée.
- Plonger dans un bain de chlorure d'or pendant 3 min
- Rincer à l'eau courante.
- Plonger dans un bain d'hyposulfite de sodium pendant 5 min
- Rincer à l'eau courante.
- Plonger dans un bain de vert lumière pendant 2 à 5 min
- Rincer à l'eau courante.
- Déshydratation (3bains d'alcool)
- Éclaircissement (3bains de toluène)
- Montage par la colle

Résultats

- Les parois des champignons, parasites et levures : noires.
- Le fond de la préparation : vert.

Remarque

- Utiliser des produits chimiquement purs, de l'eau bidistillée, de la verrerie rigoureusement propre.
- Proscrire tout objet métallique.
- Neutraliser la solution de nitrate d'argent avant son évacuation en ajoutant du chlorure de sodium (apparition d'un précipité blanc).



Chapitre 5

Immunohistochimie

- EL JIAR Mohammed
- HAJAMI Kaoutar
- SIKAL Nabila
- SERBOUTI Jinane
- EL OUARDI Kaoutar
- CHRAÏBI Mariame

Principe

L'immunohistochimie est une technique complémentaire nécessaire pour affiner le diagnostic. Elle est utilisée sur les prélèvements tissulaires et cellulaires depuis plus de vingt ans, et a un triple rôle à la fois diagnostique, pronostique et thérapeutique. Elle est basée sur l'identification de récepteurs antigéniques sur coupes d'un constituant tissulaire par réaction immunologique antigène anticorps, le type d'antigène recherché peut être cellulaire (cellules épithéliales, lymphocytes...) ou une immunoglobuline (IgG, IgM...), ou même une sécrétion hormonale comme (la calcitonine, la gastrine...)

Le marquage se fait selon deux méthodes, directe et indirecte :

- **Marquage direct** : Par l'anticorps spécifique de l'antigène recherché qui se fixe sur lui s'il est présent, constituant ainsi un complexe antigène-anticorps qui ne sera pas éliminé par le lavage et sera par la suite visualisé au microscope. L'anticorps ensuite s'accouple avec l'enzyme pour une visualisation colorée obtenue à l'aide de son substrat.

- **Marquage indirect** : Cette méthode est plus sensible mais plus longue, l'anticorps spécifique comporte plusieurs sites antigéniques, on y ajoute l'anticorps secondaire marqué par une enzyme, pour le rendre visible au microscope.



Figure 33 : Système de révélation immunohistochimique - Kits ABC (Complexe Avidine/Biotine)

Technique [7]

Réactifs

Les réactifs utilisés pour la technique d'immunohistochimie sont :

- La solution de lavage : PBS
- Les solutions pH6 et pH9
- Les anticorps
- L'anticorps secondaire HRP
- La solution d'hydrogène peroxydase H₂O₂
- Le substrat-chromogène (DAB)
- L'hémalum

Mode opératoire : Technique manuelle

La technique manuelle passe par les étapes suivantes :

- Réaliser des coupes de 3 à 4 μ m et se font sur les lames selon les pH des anticorps (pH 6 ou 9)
- Mettre les lames dans des paniers selon leur PH dans l'étuve toute la nuit à 37°C ou à 60°C pendant une heure.
- Déparaffiner les coupes dans deux bains de toluène (5 minutes chacun)
- Déshydrater dans deux bains d'alcool à concentration croissante (3 minutes chacun)
- Passer dans l'eau (5 minutes)
- Démasquer les coupes dans des solutions de pH adéquates
{pH9 : 300ml eau distillée + 30ml EDTA ; pH6 : 300ml eau distillée + 30ml citrate}

- Mettre dans le bain marie pendant 45 minutes à une température de 95 à 100°C.
- Mettre les paniers des lames dans les portoirs déjà placés dans le bain marie lorsque la température de ce dernier atteint 95 à 100°C.
- Faire sortir les portoirs du bain marie et les laisser refroidir pendant 30min
- Les tremper dans le PBS pendant 10min
{PBS au 1/10 : 450ml ED + 50ml PBS ; PBS au 1/20 : 475ml ED + 25ml PBS}
- Mettre les lames dans des chambres humides (par ordre d'Ac)
- Entourer les coupes par un stylo Pap-pen
- Recouvrir les lames par une solution d'hydrogène peroxydase H₂O₂ pendant 10 min
- Rincer dans le PBS (5 minutes)
- Appliquer l'Anticorps primaire pendant 50min
- Rincer dans le PBS (5 minutes)
- Appliquer l'anticorps secondaire (HRP) pendant 40min
- Rincer dans le PBS (5 minutes)
- Appliquer un substrat chromogène (DAB) : 5gouttes de chromogène + 5ml de substrat pendant 5 min
- Laver à l'eau de robinet
- Contre colorer à l'Hémalun pendant 1min -5min
- Laver à l'eau de robinet
- Laver au PBS
- Déshydrater et monter les lames.

Mode opératoire : Technique automatisée [26]

La technique d'immunohistochimie automatisée passe par quatre étapes, décrites ci-dessous :

1^{ère} étape : Préparation des lames :

- Les coupes sont réalisées entre 3 à 4 µm sur des lames spéciales d'immunohistochimie
- Mettre les lames dans l'étuve toute la nuit à 37°C ou pendant une heure à 60°C
- Le lendemain (si les lames sont restées une nuit) les mettre dans des racs selon le pH convenable
- Mettre la lame témoin externe dans le rac convenable

2^{ème} étape : Démasquage, déparaffinage, réhydratation : dans le PT Link

L'unité de prétraitement PT Link est Composée de deux bacs, dont on verse pour chacun 1,5 litre d'eau distillée + un flacon de solution de démasquage (pH6 et pH9).

Remarque : - Il faut renouveler la solution au bout de 5 utilisations et nettoyer les bords des bacs régulièrement.



Figure 34 Unité de prétraitement des coupes
PT Link - Laboratoire d'ACP, CHU TTA

Le protocole d'utilisation :

- Allumer le PT Link
 - Lancer le préchauffage jusqu'à atteindre la T° initiale (précisée en 65 °C).
 - Ajouter les lames sur le logiciel (Connexion-> Nouvelles lames-> Remplir les infos-> Ajouter lame -> imprimer les étiquettes et les appliquer aux lames convenables)
 - Mise en place des racs dans les bacs convenables
 - Démarrer le prétraitement des lames (qui dure environ 1h15)
 - Récupérer les racs et les placer dans le Wash Buffer pendant 3 min avant de passer à l'autostainer
- Remarque : Le PBS est dilué au 1/20 (50 ml de PBS pour 1L d'eau distillée)

3^{ème} étape : La technique d'immunohistochimie sur l'automate

- Vérifier les niveaux du PBS et d'eau distillée nécessaires.
- Placer les flacons des réactifs de façon séquentielle, code à barres à droite dans les bacs.
- Placer les racs des lames dans l'automate
- S'assurer de la présence des réactifs nécessaires pour le traitement des lames (manuellement ou par scan).

Lancer la technique à travers le logiciel.

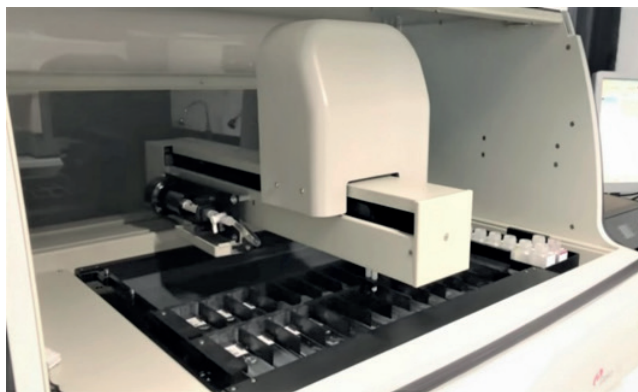


Figure 35 Automate d'Immunohistochimie - Laboratoire d'ACP, CHU TTA

Remarque : Le PBS est dilué au 1/20 (50 ml de PBS pour 1L d'eau distillée)

4^{ème} étape : La contre coloration

- Contre colorer les lames à l'Hémalun pendant 1-5min
- Laver à l'eau de robinet
- Laver au PBS
- Déshydrater et monter les lames

Résultats

- La coloration brune indique la présence de l'anticorps.

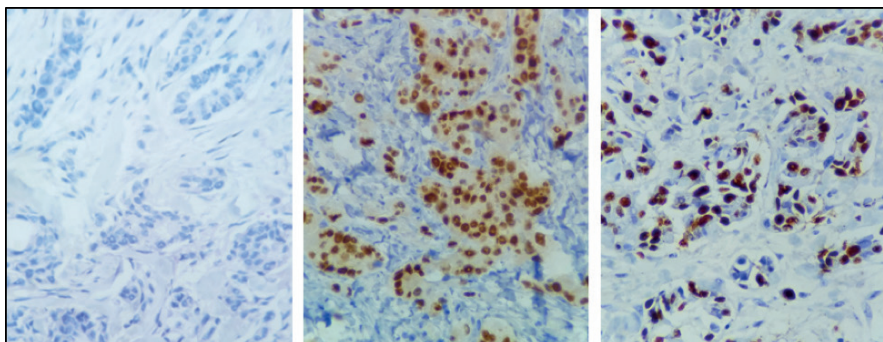


Figure 36 : Etude immunohistochimique des récepteurs hormonaux, absence de marquage des cellules tumorales (A), et présence d'un marquage nucléaire d'intensité modérée (B) et d'intensité forte (C) (Laboratoire d'ACPT CHU TTA)

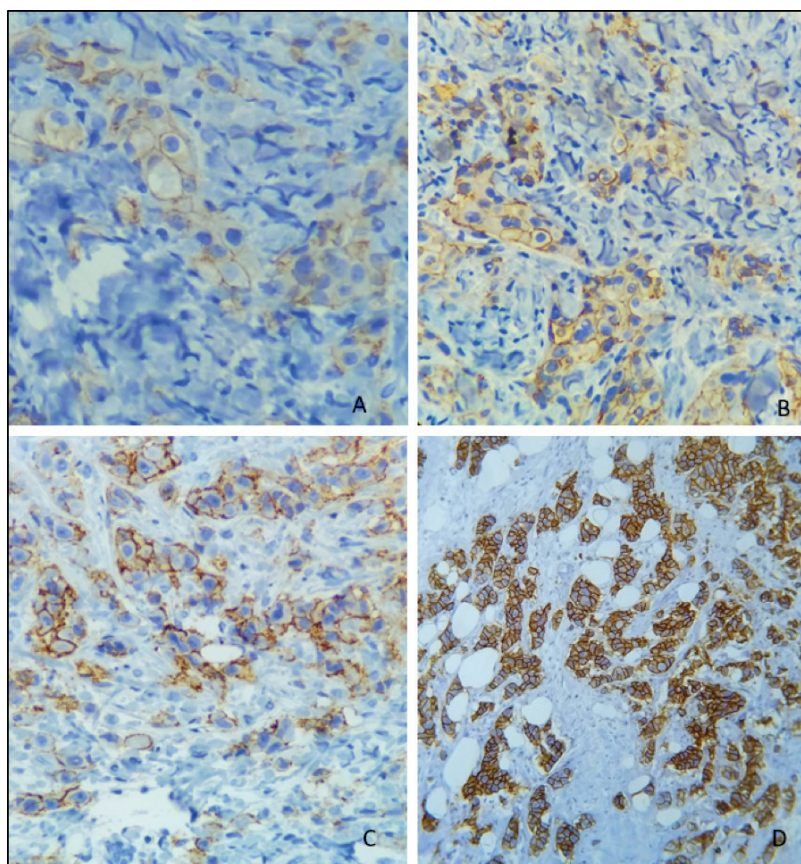


Figure 37 : Etude immunohistochimique des récepteurs Her2 : A)
Score 1+; marquage membranaire faible incomplet. B,C)
Score 2+ Equivoque; marquage membranaire modéré complet. D)
Score 3+ : Marquage membranaire fort complet sur >10% des cellules tumorales

Recommandations pour la technique d'IHC

Type de description : Recommandations GEFPICS pour le cancer du sein :

Pour réussir l'immunohistochimie, il faut veiller à respecter des recommandations afin d'optimiser les résultats.

Les recommandations du Groupe d'étude des facteurs pronostiques immunohistochimiques dans le cancer du sein GEFPICS concernent essentiellement la phase pré-analytique pour l'évaluation de HER2 et des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein. Il faut respecter certaines mesures décrites ci-dessous et déjà citées dans le chapitre (Technique standard).

- Le temps d'ischémie froide : Quelques minutes pour les biopsies et maximum une heure pour les pièces opératoires pour que la tumeur soit au contact du fixateur le plus rapidement possible. La traçabilité de l'heure de fixation s'avère alors nécessaire.
- Le Fixateur : Généralement le formol neutre tamponné à 10%.
- La durée de fixation : Minimum 6h et maximum 72h.
- L'Inclusion : la température de paraffine ne doit pas dépasser 60°C, en évitant les temps d'attente dans la paraffine chaude.
- La préparation des lames : réalisation des coupes de 3-5µm, le séchage demande une heure à 56°C ou une nuit à 37°C dans l'étuve.
- La conservation des lames est possible à +4°C pour maximum 15 jours.

Les problèmes rencontrés

Certains problèmes peuvent être rencontrés durant la technique d'IHC. C'est nécessaire de savoir les détecter pour éviter de faux résultats.

Tableau 3 : Quelques problèmes rencontrés durant l'IHC, leurs causes probables et l'action préventive à adopter

Problèmes rencontré	Cause probable	Action préventive
Coloration d'aucune lame	<ul style="list-style-type: none"> - les réactifs n'ont pas été utilisés dans l'ordre ou adéquatement. - un chauffage excessif des coupes de tissus montés, avant déparaffinage et démasquage des antigènes par la chaleur, peut entraîner une perte de l'immunoréactivité visible de la protéine HER2. 	<p>Le séchage se fait soit :</p> <ul style="list-style-type: none"> - A l'air libre et à température ambiante pendant au moins 12h. - A 37°C pendant une nuit. - A 60°C une heure au maximum.
Coloration faible des lames	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode de fixation inappropriée. - Mauvaise restauration de l'épitope. - Chauffage excessif des coupes de tissus montées. - Durée d'incubation des réactifs inadéquate. - Volume de réactifs appliqué insuffisant. 	<ul style="list-style-type: none"> - éliminer une surfixation -Vérifier que la solution de démasquage atteint une température de 95°C à 99°C durant 40 minutes pleines, et laisser refroidir pendant 20 minutes supplémentaires. -Respecter les T° et les durées appropriées. -Respecter les instructions de la procédure de coloration. -Vérifier le volume de réactifs appliqué.
Coloration de fond excessive des lames	<ul style="list-style-type: none"> -Liaison non spécifique des réactifs aux tissus. -Elimination incomplète de la paraffine. -Lames pas bien rincées. -Coupes séchées au cours de la procédure de coloration. 	<ul style="list-style-type: none"> -Vérifier la méthode de fixation de l'échantillon et la présence de nécrose. -Utiliser une préparation fraîche de tampon de lavage. -Utiliser des solutions fraîches dans les bains de tampon et les flacons de lavage. -Utiliser une chambre humide. - N'essuyer que trois à quatre lames à la fois avant d'appliquer le réactif.
Le tissu se détache des lames	<ul style="list-style-type: none"> -Méthode de fixation inappropriée. -Utilisation de lames inadéquates. -Chauffage excessif des coupes de tissus montés. 	<p>S'assurer que le fixateur approuvé a été utilisé.</p> <p>Utiliser des lames sialinisées</p>

Coloration spécifique trop forte	<ul style="list-style-type: none"> -Méthode de fixation inappropriée. -Utilisation d'une source de chaleur inappropriée pour la restauration de l'épitope. -Durées d'incubation des réactifs trop longues. -Solution de lavage inappropriée. 	<ul style="list-style-type: none"> -S'assurer que seuls des fixateurs et des méthodes de fixation approuvés ont été utilisés. -S'assurer que seul un bain de lavage est utilisé pour l'étape de restauration de l'épitope. -Recevoir les instructions de la procédure de coloration. -Utiliser le tampon de lavage recommandé pour le kit.
Faux négatif	<ul style="list-style-type: none"> -Des faux négatifs peuvent être dus à une dégradation de l'antigène dans les tissus au fil du temps. 	<ul style="list-style-type: none"> -Les échantillons doivent être colorés dans les 4 à 6 semaines suivant le montage des tissus sur les lames lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (20 à 25°C) ou 15 jours à 4°C (AFAQAP).
Faible coloration de la lignée cellulaire de la lame de contrôle 1+.	<ul style="list-style-type: none"> -Mauvais protocole de restauration de l'épitope. -Manque de réaction à la solution de substrat chromogène (DAB). -Dégradation de la lame de contrôle. 	<ul style="list-style-type: none"> -Immerger les lames dans une solution de restauration de l'épitope préchauffée. Ramener la solution de restauration de l'épitope à une température de 95 à 99 °C et préchauffer durant 40 minutes pleines. -Veiller à une incubation durant 10 minutes pleines. Veiller à n'ajouter qu'une goutte de chromogène DAB à 1ml de substrat tamponné DAB. -Vérifier la date de péremption et les conditions de conservation du kit indiquées sur la boîte.



Chapitre 6

Immunofluorescence

- IDRISSE Karima
- SIKAL Nabila
- CHRAÏBI Mariame

Immunofluorescence IF

Définition

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage qui utilise des anticorps, ou immunoglobulines, ainsi que des fluorochromes, liés chimiquement à une substance fluorescente pour démontrer la présence d'une molécule donnée. Comme les dépôts sont des protéines, on utilise pour les mettre en évidence la réaction anticorps-antigène avec comme cibles antigéniques des fragments d'anticorps. L'immunofluorescence, en tant que technique de coloration, peut être utilisée dans des coupes de tissus, des lignées cellulaires cultivées, des cellules individuelles et des sécrétions contenant des cellules en suspension, afin d'analyser la présence et la distribution de protéines, de glucides et de petites molécules. [27]

Principe

L'immunofluorescence vise la reconnaissance d'une protéine produite par le bioagresseur, appelée antigène, par une protéine produite en laboratoire appelée anticorps qui est spécifique à l'agent recherché. Pour la révélation, une protéine fluorescente est liée à un second type d'anticorps. La protéine fluorescente émet de la lumière lorsqu'elle est exposée à une certaine longueur d'onde. La lecture s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence. Si l'agent n'est pas présent, il n'y a pas émission de couleur, car les anticorps ne se sont pas fixés.

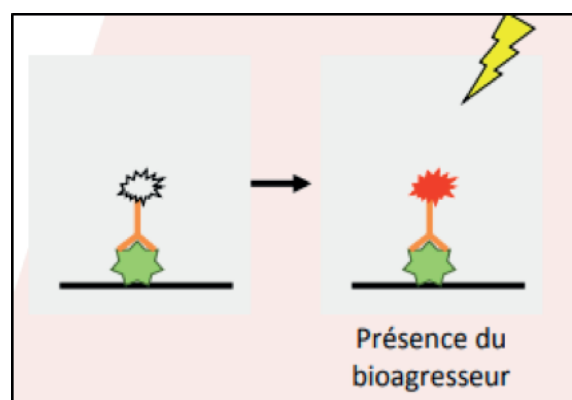


Figure 38 Schéma montrant la fixation de l'Anticorps primaire-couplé à la protéine fluorescente- sur le bioagresseur : IFD.

Immunofluorescence indirecte

Pour pallier aux problèmes d'intensité lumineuse, l'immunofluorescence indirecte est préférée. Dans cette technique, un anticorps primaire monoclonal se fixe sur le bioagresseur. Ensuite, un anticorps secondaire polyclonal qui possède une forte affinité pour l'anticorps primaire est ajouté. Les anticorps primaires présentent différents sites de fixation. Plusieurs anticorps secondaires peuvent donc s'y lier, ce qui décuple ainsi l'intensité lumineuse. C'est aussi une technique moins onéreuse que l'immunofluorescence directe.

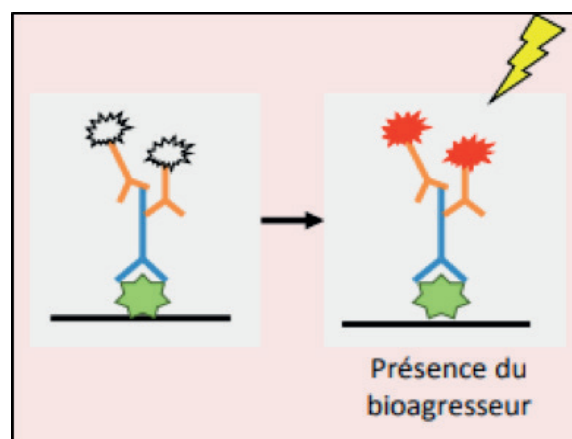


Figure 39 Schéma résumant le principe de l'immunofluorescence indirecte.

Technique

Protocole général de l'IF

L'immunofluorescence sert à localiser des sites antigéniques tissulaires à l'aide d'un anticorps conjugué à un fluorochrome.

Préparation et acheminement du tissu

Classiquement, le prélèvement est déposé sur une compresse imbibée de sérum physiologique glissée dans un petit tube (Ex. tube sec de 9ml), puis amené au laboratoire en urgence ou il sera immédiatement congelé puis techniqué. La congélation d'une biopsie doit se faire dans maximum 30min après le prélèvement. L'intérêt de la congélation est triple : réalisation d'études en immunofluorescence directe, réalisation de techniques de biologie moléculaire (pathologie tumorale), stockage.

Confection des coupes

Les coupes qui sont habituellement faites au cryostat, devraient avoir une épaisseur allant de 2 à 5 microns. Il est recommandé de les déposer sur des lames de verre chargées positivement afin de faciliter leur adhérence. La décision de recourir à la fixation, la durée de séchage et tout autre aspect technique de l'immunofluorescence sont validés suivant l'antigène recherché. Les coupes tissulaires peuvent être conservées au réfrigérateur ou congelées si l'analyse doit être réalisée plus tard. [28]

Conservation du tissu non utilisé

Idéalement, les tissus devraient être conservés à une température d'au moins -80 °C. Ils devraient être enveloppés dans du papier Parafilm ou du papier d'aluminium avant d'être mis dans un récipient allant au congélateur. Il ne faut pas laisser les tissus trop longtemps dans un congélateur réglé à -20 °C pour éviter les artéfacts de congélation. Il est cependant possible de conserver temporairement les tissus à une telle température. [28]

Montage

On utilise un milieu de montage aqueux à pH neutre afin de prévenir l'oxydation du fluorochrome et une baisse d'intensité de la réaction fluorescente. La coupe doit être montée rapidement et conservée à l'abri de la lumière sous peine de perdre sa fluorescence. [28]

Contrôle de la qualité

Dans le cas de l'immunofluorescence, un contrôle de qualité interne devrait se traduire par l'utilisation de témoins positifs et négatifs pour chaque anticorps. [28]

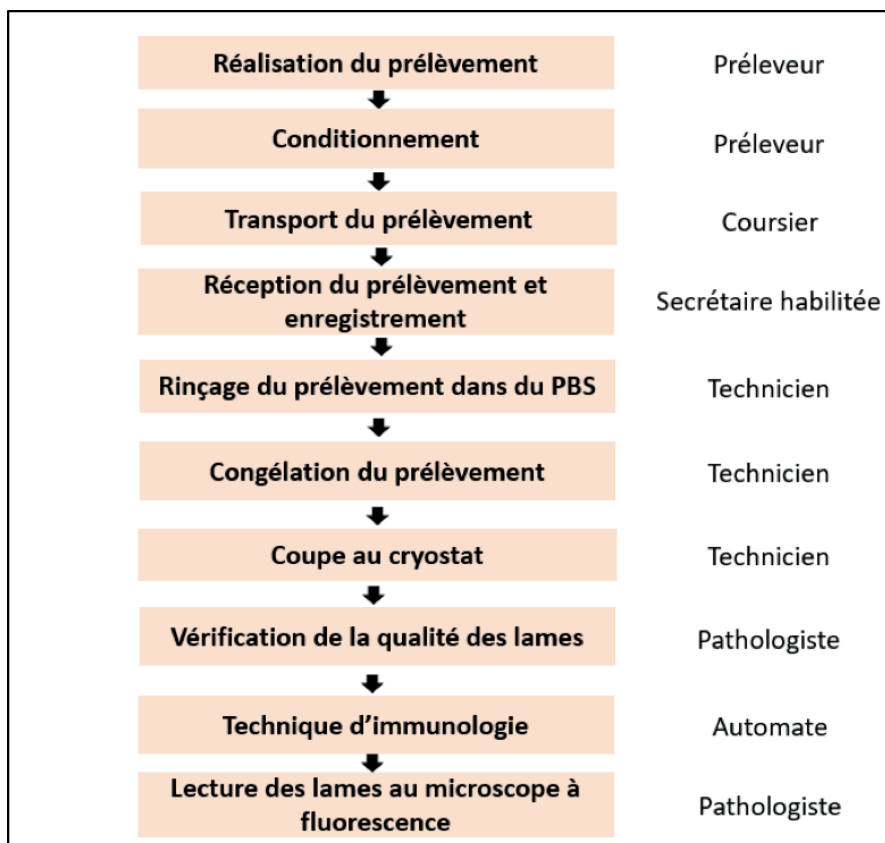


Figure 40 : Schéma général du déroulement de l'IF (ACPT)

L'IF pour la biopsie rénale

La congélation

Le fragment peut être congelé par immersion rapide dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide ou directement dans l'azote liquide. Pour certains, il est placé dans du Tissutek, produit qui durcit au contact de l'azote liquide. Lorsque le prélèvement doit être acheminé dans un autre laboratoire, il est transporté dans un tube en plastique au froid avec de la carboglace et est congelé sur place, en évitant les décongélations. [29]

Immunofluorescence « directe » du tissu congelé

C'est une technique rapide qui ne demande que 2 heures, ce qui est précieux dans certaines pathologies exigeant un résultat et un traitement urgent comme les glomérulonéphrites rapidement progressives.

- Les coupes faites en série du tissu d'une épaisseur de 2 à 3 μm sont obtenues avec un cryostat.
- Une « incubation » des anticorps sur les coupes (selon les cas non fixés ou fixés à l'acétone pendant 10 minutes) a lieu en atmosphère humide pendant 30 minutes.
- Les préparations sont ensuite rincées au tampon.
- Le montage est réalisé à la glycérine tamponnée.
- Les coupes sont examinées avec un microscope équipé d'une lampe à ultraviolets. Les préparations périssables sont photographiées immédiatement.

Remarque :

La fluorescence « vive verte » s'éteint sous les rayons en moins de 2 minutes, exigeant de les regarder rapidement et de les conserver à l'abri de la lumière et au froid. En revanche, le reste du prélèvement congelé est conservé dans l'azote liquide des années, et peut être réutilisé si besoin pour d'autres investigations dans les mêmes conditions. [29]

L'IF pour la biopsie cutanée

Transport

Une fois le prélèvement biopsique est réalisé, l'acheminement au Laboratoire d'Anatomie Pathologique peut se faire de deux manières :

- Immédiatement (Laboratoire à proximité) dans une compresse imbibée de sérum physiologique.
- Ou dans le liquide de Michel qui est un milieu de transport spécial (Solution de sulfate d'ammonium tamponnée).

Les biopsies sont acheminées à température ambiante dans le milieu de Michel ; les délais d'acheminement vont de 48 H à 10 jours donnant des résultats comparables à l'acheminement immédiat. Avant d'être fixé, le fragment sera rincé avec une solution tampon neutre. [30]

Fixation au laboratoire

Le fragment destiné à l'IFD subit immédiatement une fixation par le froid (congélation). Il est placé dans un tube, dans un récipient en plastique ou dans un petit réceptacle en aluminium avant d'être plongé dans l'azote liquide et stocké

à -20°C (quelques mois) ou mieux à -80°C.

La congélation est une étape indispensable à la préparation des échantillons à étudier, elle a pour but : de conserver une bonne antigénicité tissulaire, d'augmenter la rigidité tissulaire indispensable à la coupe. Mais la congélation ne permet pas une bonne conservation histologique, elle est donc peu recommandée pour les cas où l'analyse morphologique est importante. [30]

Réalisation de la technique de l'IFD cutanée (directe)

La biopsie cutanée congelée est sectionnée en coupes de 4 à 6 microns au Cryostat, puis les coupes sont placées sur lames chargées positivement et congelées à -50°C. [30]

Au moment de la technique :

- Sortir les lames du congélateur et les sécher 5 min à l'air ou au ventilateur.
- Fixer les coupes 10 mn à l'acétone à +4°C.
- Sécher les coupes 2 mn à l'air libre.
- Laver dans un tampon phosphate salé (P.B.S) pH 7,2 pendant 10 mn.
- Incuber avec les conjugués fluorescents centrifugés : anticorps fluorescents, anti-IgG, anti-IgA, anti-Ig-M, et anti-C3, cette incubation dure 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Chaque conjugué est appliqué sur une lame à part.
- Laver dans du tampon P.B.S P pH 7,2 deux fois 15 mn pour éliminer les réactifs non liés.
- Monter les lames à la glycérine tamponnée et les laisser à l'obscurité jusqu'à la lecture.

Sensibilité et spécificité de l'IFD

Sensibilité de l'IFD et contrôle positif

La sensibilité de l'IFD est définie par la quantité minimale de motifs antigéniques pouvant être détectés par cette technique. Une bonne sensibilité de l'IFD cutanée dépend de différents facteurs :

- Respect du site approprié de la biopsie.
- Fixation et transport correct de l'échantillon.
- Technique rigoureuse et lecture des lames sans retard.

Des difficultés dans l'une de ces étapes peuvent causer la survenue d'IFD « faux-négatives ». En pratique, il est indispensable de posséder un contrôle positif qui permet d'évaluer la sensibilité de chaque expérience. En IFD, le meilleur contrôle est interne, représenté par des cellules de la peau normale adjacente connues pour exprimer l'antigène recherché, sinon, une coupe d'un autre tissu contenant le motif antigénique peut également être utilisé.

Spécificité de l'IFD et contrôle négatif

Elle correspond à la détection réelle du motif antigénique recherché. Elle doit être soigneusement vérifiée, car il existe plusieurs causes de réactivités faussement positives (fluorescences parasites). La vérification de la spécificité de l'IFD, ou contrôle négatif, est très importante mais quelques fois difficile à obtenir. La méthode la plus rigoureuse est la préincubation de l'anticorps spécifique avec l'antigène purifié qui doit abolir l'immunoréactivité de l'anticorps utilisé ensuite dans la réaction d'IFD. Cette méthode étant très difficilement réalisable, on se contente en pratique de la substitution de l'anticorps spécifique avec un anti-sérum non immun, ce qui doit conduire également à une absence de réactivité.

Avantages et inconvénients de l'IF

Avantages

Les avantages de la technique d'IF :

- La possibilité de réaliser des marquages multiples sur un même échantillon de cellules
- La rapidité et la facilité d'utilisation de cette méthode
- La bonne fiabilité de la technique

De plus en immunofluorescence indirecte, on a une augmentation de l'intensité lumineuse, car il y a plusieurs sites de fixation sur les anticorps primaires, ce qui permet d'avoir plusieurs anticorps secondaires fixés dessus. [31]

Inconvénients

- Nécessité d'utiliser des tissus frais ; congelés.
- Impossibilité de conserver des lames plus de 24H.
- Décroissance rapide de fluorescence lors de l'exposition des coupes à la lumière ultraviolette.
- Absence d'examen morphologique de la coupe.
- Coût élevé.

Remèdes

L'extinction de la fluorescence en cours d'examen est prévenu ou ralenti par l'emploi d'un tampon de montage contenant de la para-phenylenediamine qui autorise de plus une meilleure illumination des coupes ; une meilleure appréciation de la morphologie et d'excellentes microphotographies. [30]

Précautions pratiques de l'IFD

- L'utilisation des anticorps animaux anti-Ig humains liés à un fluorochrome (fluorescéine, rhodamine etc,) dont les dilutions sont préalablement testées avec des témoins pour contrôler la réaction Immuno-histo-chimique, car les risques d'artéfacts sont nombreux.
- Il est recommandé de colorer systématiquement une coupe congelée par l'hématéine-éosine pour lecture au microscope optique afin de vérifier la représentativité du tissu : présence ou non d'épiderme, décollement bulleux ou inflammation qui interfèrent avec la réaction immuno-histochimique et limitent la signification du résultat.
- La lecture des lames se fait au microscope à UV.
- L'instabilité de la réaction se vérifie par l'intensité de la fluorescence qui diminue quand les lames sont réchauffées à température ambiante ou sous la lampe du microscope.
- Les lames peuvent être conservées à l'abri de la lumière au congélateur pendant quelques semaines.



Chapitre 7

Techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire

- IDRISSE Karima
- EL ASYOUTE Wiam
- CHERRAK Imane
- SIKAL Nabila
- Mouatakid Mohammed
- CHRAÏBI Mariame

Introduction

La pathologie moléculaire est une discipline qui permet l'étude et le diagnostic des pathologies à travers l'étude moléculaire des organes, tissus et liquides. C'est une simple définition qui existe sur Google et qui pour une fois donne la légitimité aux pathologistes de l'intégrer dans leur arsenal diagnostique. La classification moléculaire est une partie intégrante du diagnostic de la majorité des cancers

Le concept de Médecine personnalisée et l'explosion des thérapies ciblées en Oncologie ont pour conséquence directe la mise en place de plateforme de biologie moléculaire afin de rendre accessible les tests de détection d'altérations somatiques à tous les patients sur l'ensemble de la région Tanger Tétouan Al Hoceima. Le nombre croissant des publications consacrées à l'intégration de la biologie moléculaire en anatomie pathologique dans les revues anglo-saxonnes de pathologie témoigne de la nécessité de développer ce secteur d'activité au sein de notre laboratoire d'ACP, s'inscrivant dans un objectif d'innovation dans les comptes rendus anatomopathologiques permettant une autonomie pour un diagnostic personnalisé le plus complet possible.

Le laboratoire d'ACP a l'obligation d'initier et de développer les techniques de cytogénétique et de Biologie moléculaire, qui ne sont qu'une extension des techniques, et qui permettront dans le cadre du grand projet canceropôle d'avoir l'opportunité pour les patients de la région que ça soit le secteur public ou libéral d'assurer un diagnostic personnalisé, offrant des thérapeutiques à la carte afin d'améliorer le pronostic des patients surtout en oncologie.

Les missions de la plateforme de biopathologie

Pour les pathologistes : la principale mission est d'assurer l'analyse des mutations somatiques des cancers solides et hématologiques, vu que le diagnostic morphologique est assuré par les pathologistes, qui eux seuls ont la légitimité de veiller sur la phase préanalytique, analytique et postanalytique arrivant à un compte rendu de biologie moléculaire, signé par le pathologiste.

L'intérêt est triple à la fois diagnostique, pronostique et thérapeutique (traitement personnalisé)

La plateforme de Biopathologie a une mission de promouvoir la recherche surtout en Oncologie et de participer de façon efficiente au développement des nouveaux outils diagnostiques au Maroc sans avoir recours à aller à l'étranger

La procédure de demande d'analyse moléculaire au laboratoire de biopathologie

Sur la demande des cliniciens notamment des oncologues, une demande d'analyse moléculaire, sera remplie et adressée au pathologiste, qui se charge de faire le test de Biologie moléculaire et par la suite de formuler un compte rendu qui sera validé par une double signature. Figure 41

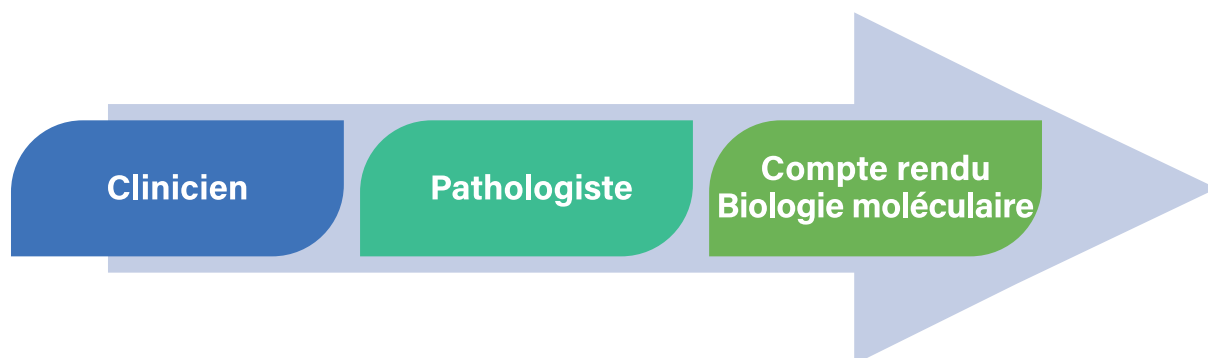


Figure 41 Procédure de demande d'analyse moléculaire

La demande d'analyse moléculaire au laboratoire de biopathologie

La demande d'examen de pathologie moléculaire est transmise au laboratoire de biopathologie avec un certain nombre d'informations associées concernant le patient, la date du prélèvement, le type de mutation à rechercher.

Le circuit du prélèvement au laboratoire de biopathologie

Une demande d'analyse moléculaire est transmise au laboratoire d'ACP, sera dans un premier temps validée et complétée par le pathologiste, qui se charge de sélectionner le bloc et la lame correspondante. Il est important que le continuum entre le diagnostic morphologique et l'indication d'un examen de pathologie moléculaire soit réalisé au sein du même laboratoire, et par une même équipe de pathologistes qui ont une double compétence de pathologiste morphologiste et moléculaire.

Ce type de fonctionnement permet de mieux gérer les indications et les limites des examens réalisés en aval du diagnostic morphologique (extraction de l'ADN, amplification, contrôle de qualité de l'ADN).

Le choix de la technique est discuté selon le cas. La vision est de privilégier les méthodes automatisées, en utilisant des procédures développées par le fournisseur, afin d'utiliser des kits commercialisés. Cette approche appelée l'adoption, autorise une vérification ; conduisant à des résultats reproductibles, afin de faciliter les procédures de mise en place de la qualité au sein du laboratoire.

La phase post- analytique consiste à rédiger un compte rendu de biologie moléculaire, qui sera validé par une double lecture. Ensuite l'archivage sera réalisé dans un logiciel. Figure 42

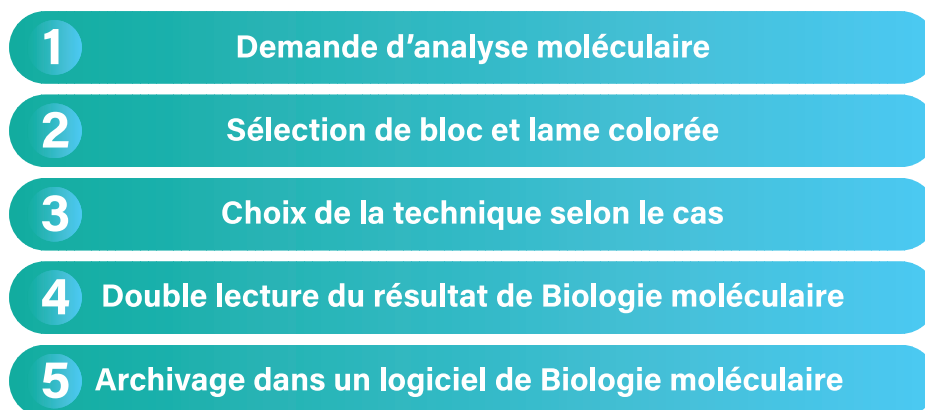


Figure 42 : Circuit du prélèvement au Laboratoire de biopathologie.

Techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire

Technique de FISH : Hybridation in situ fluorescente

Définition

L'hybridation in situ fluorescente nommée FISH est une technique de cytogénétique moléculaire permettant de marquer précisément l'acide nucléique (ADN ou ARN) dans des coupes de tissu, en utilisant un marqueur fluorescent ou un marqueur possédant un site antigénique reconnaissable par un anticorps couplé à un fluorophore. [33]

Principe

Le principe de la FISH repose sur la détection de fluorochromes de couleurs différentes (généralement rouge et vert) fixés sur des brins d'ADN que l'on hybride sur leurs séquences complémentaires situées sur le gène d'intérêt, en utilisant des sondes d'ADN fluorescentes pour cibler des emplacements qchromosomiques spécifiques dans le noyau, ce qui donne des signaux colorés qui peuvent être détectés à l'aide d'un microscope à fluorescence. [1]

Technique

Mode opératoire

Après sélection du bloc et la zone tumorale d'intérêt par le pathologiste, le technicien se charge de la réalisation des lames pour chaque test FISH. Au moins 2 lames montées sur coupe de paraffine sont nécessaires au cas où une hybridation répétée serait requise, plus une lame qui doit être utilisée comme contrôle négatif. Les lames doivent être placées à l'étuve à 65 °C pendant 8 à 16 h [34].

Types de sondes (11,12)

Il existe deux types de sondes adaptées pour la technique de FISH : sondes de fusion et sondes Break Apart

Sonde de fusion :

Il s'agit de deux sondes différentes, situées sur deux chromosomes différents.

Le rôle principal est :

- Détecter des translocations chromosomiques
- Permettre de connaître les deux partenaires

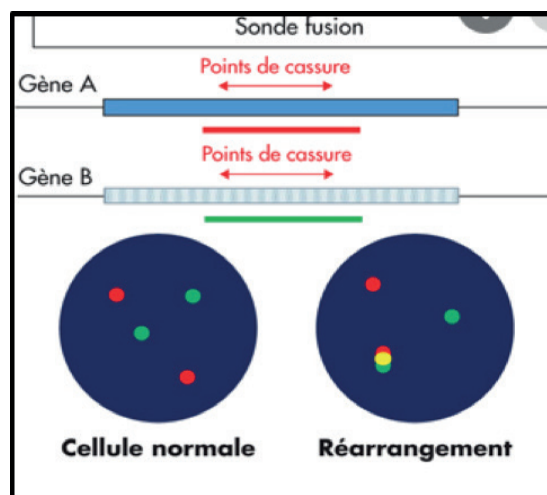


Figure 43 : schéma de technique FISH (Sonde de fusion)
(Alice Boyez, Johnny Salloum, Anatomic pathology. Hématologie. 2017;23:5-12. doi:10.1684/hma.20171201)

Sonde de Cassure « Break Apart » :

Il s'agit de deux sondes de part et d'autre de la cassure. Le rôle principal est :

- Détecter des translocations.
- Diminuer le risque de faux positifs.

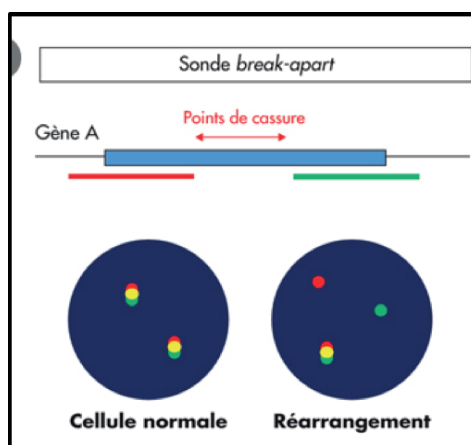


Figure 44 : Schéma de technique FISH (Sonde Break Apart)
(Alice Boyez, Johnny Salloum, Anatomic pathology. Hématologie. 2017;23:5-12. doi:10.1684/hma.20171201)

Etapes de la technique (Figure 45)

Le déparaffinage et la réhydratation

- Déparaffiner la lame dans 3 bains de xylène à TA pendant 5 minutes.
- Déshydrater la lame dans 2 bains d'éthanol absolu (2x5 minutes).
- Sécher la lame à l'air libre.

Prétraitement de paraffine

- Préchauffer la paraffine à 95°C.
- Immerger la lame dans la solution de PP à 95°C pour (30 minutes).
- Immerger la lame dans 2 bains de solution (2x SSC) pour 5 minutes.

Traitement à la protéase

- Ajouter 500 µl de protéase dans 50 ml de tampon de protéase.
- Préchauffer la solution de protéase à 37 °C dans un bain de chauffage.
- Immerger la lame dans la protéase à 37°C (10 à 20) minutes.
- Immerger la lame dans 2 bains de solution (2xSSC) pour 5 minutes

Déshydratation

- Immerger la lame dans l'éthanol 70% pendant 1 minute.
- Immerger la lame dans l'éthanol absolu pendant 1minute.
- Sécher la lame à l'air.
- Marquer la région d'hybridation par un stylo de diamant spécifique.
- Ajouter la sonde FISH et couvrir la lame par une lamelle.
- Coller la lame et lamelle par la colle de caoutchouc

Dénaturation

- Poser la lame sur une plaque chauffante à 75°C pendant 5 minutes.
- Protéger la lame de la lumière par une plaque noire

Hybridation

- Poser la lame dans une boîte humidifiée.
- Mettre la boîte dans une étuve à 37°C entre (16 à 72) heures.
- Retirer la colle.
- Démonter la lame.
- Immerger la lame dans la solution (2xSSC) à TA pour 5 minutes.
- Immerger la lame dans la solution préchauffant (2xSSC/0,3%) NP -40 à 75°C entre (1 à 2) minutes.
- Immerger la lame dans (2xSSC) à TA pour 1 minute.
- Ajouter DAPI avec montage de lame.
- Observer au microscope à fluorescence [38]

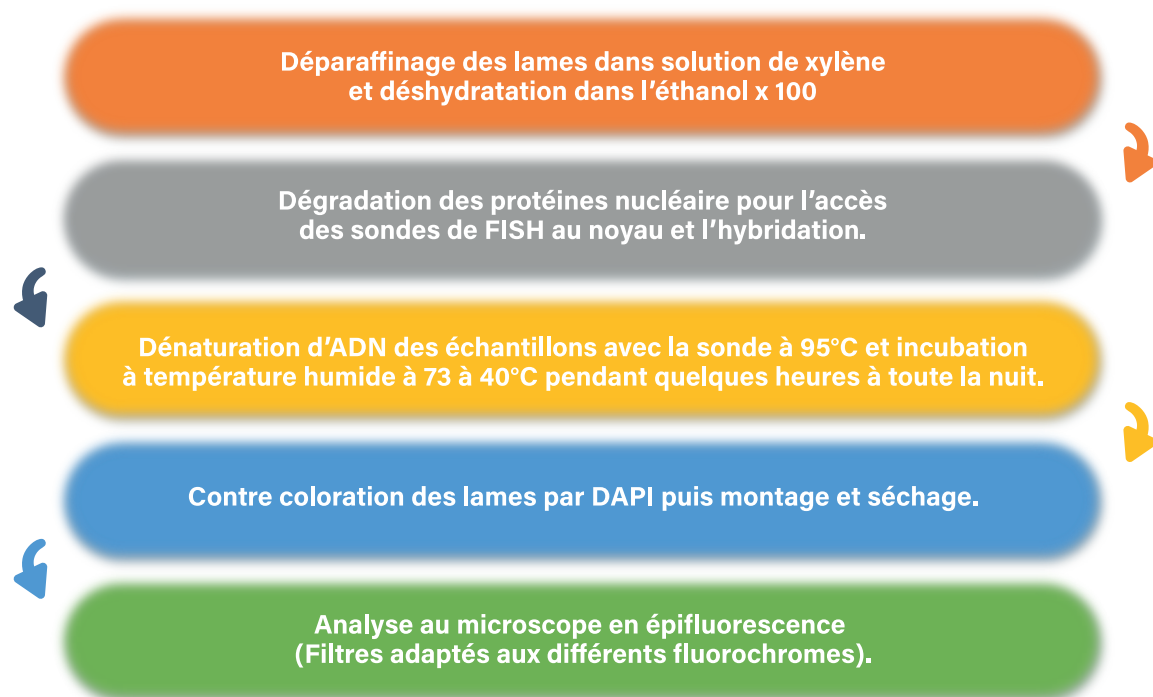


Figure 45 : schéma montrant les étapes de la technique FISH ACPT.

Avantages et inconvénients de la technique de FISH

Avantages

- Méthode robuste précise et fiable
- Technique objective et donc moins sujette à une variabilité interobservateurs
- Détecte une réelle amplification d'une fausse amplification
- Approuvée par le FDA et l'ASCO [33].

Limites

- Nécessite un personnel bien formé
- Le repérage de zones invasives des cancers doit se faire au préalable sur une autre lame
- Nécessite un équipement coûteux [33]

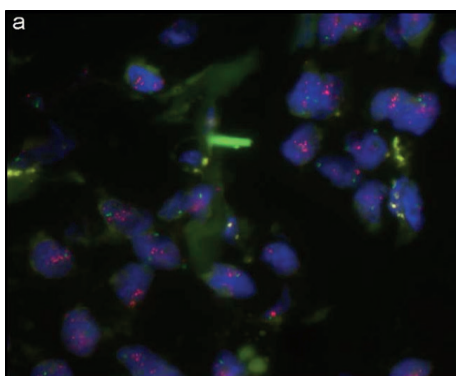


Figure 46 : Amplification du gène HER-2 au niveau des noyaux des cellules tumorales d'un carcinome mammaire (fluorochrome rouge) étudiée par technique d'hybridation fluorescente in situ (x 100) (Frédérique Penault-Llorca et al. Mise à jour 2014 des recommandations du GEPICIS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein en France. Annales de pathologie (2014) 34, 352—365)

PCR/ qPCR (PCR en temps réel)

Définition

PCR traditionnelle

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une réaction biochimique de synthèse d'ADN réalisée in vitro et de manière répétée, ce qui permet d'amplifier en grande quantité un fragment d'ADN à partir d'une matrice d'ADN qui contient ce fragment. [40]

qPCR ou PCR en temps réel

qPCR fait référence à une technique en biotechnologie qui permet la détection, la caractérisation et la quantification d'acides nucléiques en temps réel, basée sur l'émission de fluorescence durant une réaction de PCR. [41]

Principe

Principe de l'amplification par PCR

La technique de la PCR est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser de nouveaux brins d'ADN à partir d'un brin matrice proposé de manière complémentaire. Le mélange réactionnel de la PCR est composé d'ADN polymérase, de nucléotides d'ADN, d'amorces, de la matrice ADN à amplifier et de magnésium. L'amplification est réalisée à l'intérieur d'un thermocycleur.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

- Une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent (95°C).
- Une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée (50°C-65°C).
- Une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase (72°C).

Ce cycle est répété un grand nombre de fois (30 à 50 fois) pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. [42]

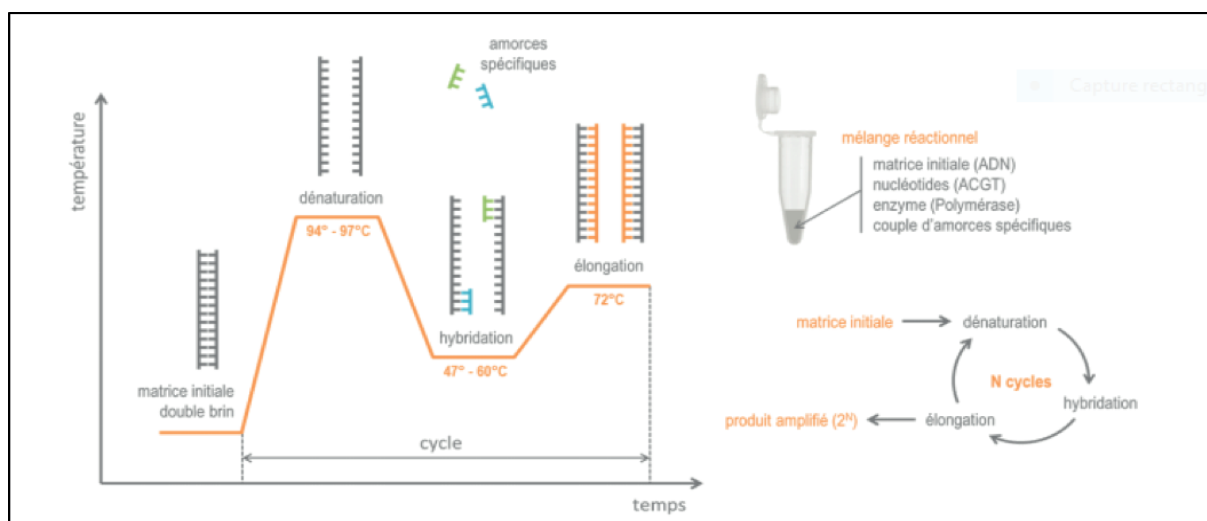


Figure 47 : Principe de la PCR. La technique est basée sur la répétition de cycles de transition de température qui alternent après une phase de dénaturation initiale des molécules d'ADN. Le mélange réactionnel contient l'ADN ou l'ADNc, la polymérase, les nucléotides et les amorces spécifiques permettant d'amplifier la région d'intérêt. Le nombre de cycles (n) constitués d'étapes de dénaturation, hybridation, élongation est généralement supérieur à 30. [43]

Principe de l'amplification par qPCR

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR traditionnelle).

Des sondes fluorescentes se fixent :

- Soit sur l'ADN double brin (ex : Technologie SYBR)
- Soit sur une séquence d'ADN précise (ex : Technologies Taqman et Beacon).

Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN.

La mesure de la fluorescence permet de déterminer en temps réel si le fragment recherché appelé l'amplicon est effectivement présent, est donc amplifié, sans avoir besoin de faire une électrophorèse par exemple. De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.

La quantité d'amplicons est corrélée à la quantité initiale d'ADN de la matrice originale, ce qui permet pour d'autres applications de doser la matrice originale. [42]

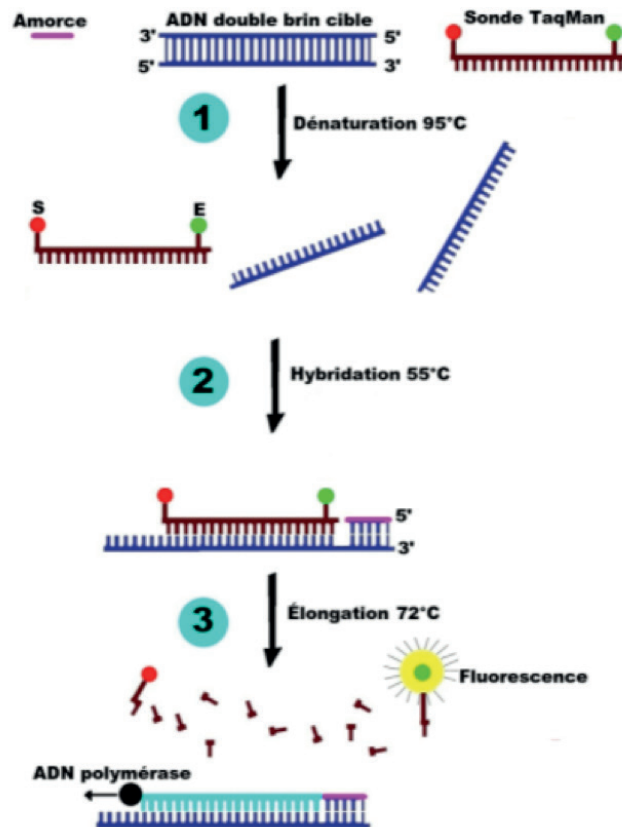


Figure 48 : La technique de l'amplification de l'ADN par QPCR
(ex : Technologie Taqman) , [44]

Similitudes et différences entre PCR et qPCR

Similitudes

La PCR et la qPCR sont deux types de techniques utilisées en biotechnologie pour amplifier l'ADN à diverses fins. La réaction en chaîne de la polymérase traditionnelle est utilisée comme technique principale à la fois en PCR et en qPCR. L'ARN peut être utilisé à la fois en PCR et en qPCR en utilisant la transcription inverse comme première réaction.

Différences

Tableau 4 un tableau comparatif entre la PCR et la qPCR [45]

Technique	PCR	qPCR
	Technique qualitative.	Technique quantitative.
Détection du produit	Par électrophorèse sur gel d'agarose en PCR.	Détection dans chaque cycle d'amplification.
Collecte des données	La fin de la réaction en PCR.	Pendant la phase exponentielle de la réaction dans qPCR.
Résolution	Très faible.	Haute résolution.
Détection du produit	Utilise le bromure d'éthidium	Utilise des colorants fluorescents
Durée de la technique	Longue	Courte
But de la technique	Détecter la présence ou l'absence de certains fragments génomiques.	Quantifier un fragment particulier dans un échantillon.

Technique (q PCR)

Protocole

Extraction

L'extraction de l'ADN est la première étape des techniques d'analyse d'ADN. Elle permet la libération et la purification de l'ADN d'un échantillon. Elle consiste à lyser les membranes cellulaires pour exposer et homogénéiser l'ADN. Une homogénéisation complète doit être réalisée pour obtenir un rendement d'ADN élevé tout en conservant l'intégrité des acides nucléiques. Pour la plupart des applications, il est important de concevoir un protocole reproductible à haut débit pour l'étape d'homogénéisation. [46]

La lyse mécanique, et plus particulièrement la technologie de bead-beating suivie (ou non) par une digestion par des protéases (protéinase K, lysozyme) a été largement reconnue comme la méthode de référence pour les protocoles d'homogénéisation des échantillons et d'extraction d'ADN. [46]

PCR quantitative (q PCR)

Réactifs

- Matrice d'ADN.
- Amorce sens.
- Amorce anti sens.
- Master Mix (2X).
- Eau de qualité PCR.

Protocole général

Etape 1 : Réaction d'installation de la q PCR

- Avant la préparation des réactions de q PCR, il faut bien mélanger l'ADN matrice, les amorces et les sondes.
- Ensuite, il faut calculer les volumes requis de chaque composant selon le tableau suivant :

Tableau 5 : Différents réactifs utilisés dans la technique q PCR

Concentration finale 20µl	
Eau de qualité PCR jusqu'à 20µl	Selon besoin
Master Mix (2X) qPCR	1x 10µl
Amorce sens (10µM)	200 nM 0.4µl
Amorce antisens (10µM)	200 nM 0.4µl
Matrice ADN	(<20ng/20µl) variable

Etape 2 : Configuration de la plaque

- Transférer le volume approprié du mélange réactionnel dans chaque puit d'une plaque ou dans un tube de PCR. Les volumes réactionnels peuvent être réduits de 20µl à 10µl si des tubes/plaques de faible volume sont utilisés.
- Couvrir ou sceller le tube/ la plaque de réaction et centrifuger brièvement.

Etape 3 : Exécution de la réaction q PCR

- Si possible, sélectionner le mode rapide sur l'instrument.
- Programmer le protocole suivant :
 - Activation enzymatique à 95 °C pendant 20 sec - 3 min (1 cycle)
 - Dénaturation à 95 °C pendant 1-3 sec
 - Appariement/Elongation/Acquisition à 60 °C moins de 20 sec
 - Réalisation de 40 cycles des 2 derniers points.

Etape 4 : Analyse des résultats

- L'analyse des données varie en fonction de l'instrument utilisé. Se référer à votre guide de l'utilisateur de l'instrument. [48]
- Pour avoir la meilleure efficacité possible : amplicons de petite taille (70 à 250/300 bp).
- Principe général de détection : utilisation d'un (ou plusieurs) fluorochromes (l'émission de fluorescence est le reflet de la quantité d'ADN synthétisée à chaque cycle).
- Principe des appareils de q-PCR: un thermocycleur couplé à un fluorimètre qui mesure la fluorescence émise à chaque cycle (fluorimètre= laser pour exciter les fluorochromes+ système de détection de la fluorescence émise). [50]

Avantages et inconvénients de la q-PCR

Tableau 6 : Avantages et inconvénients de la q-PCR.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">-Méthode simple à mettre en œuvre, en particulier au niveau du choix des amorces.- Très nombreuses applications (génotypage, étude de l'expression des gènes...).- Détection des amplicons de petite taille (70 à 250/300 bp).- Utilisation d'un (ou plusieurs) fluorochromes (l'émission de fluorescence est le reflet de la quantité d'ADN synthétisée à chaque cycle).- Coût.	<ul style="list-style-type: none">- Risque possible d'aspécificité (production d'amplicons aspécifiques, quantifiés comme les amplicons spécifiques).- Dépend de la qualité de fluorimètre couplé à thermocycleur.- Temps et logistique.

Next Generation Sequencing

Définition

Le séquençage de nouvelle génération ou (NGS) « next generation sequencing » est un terme qui regroupe l'ensemble des techniques récentes de séquençage basées sur un séquençage massivement parallèle. Cela consiste à séquencer individuellement chaque fragment d'ADN pour plusieurs échantillons sur une même puce. [56] Cette technologie offre un grand avantage par rapport aux techniques de séquençage traditionnelles de par son débit, son coût réduit, sa rapidité et sa grande sensibilité pour la détection de mutations dans l'ADN. Le NGS permet différentes applications comme le séquençage de génomes entiers, d'exome, de transcriptome ou le séquençage ciblé de multiples régions [57].

Globalement, les techniques NGS sont assez proches et peuvent être présentées en quatre étapes :

- Fragmentation mécanique ou enzymatique de l'ADN génomique.
- Construction d'une librairie par amplification ou capture des régions d'intérêt.
- Amplification et enrichissement.
- Dépôt de l'ADN sur le séquenceur.

Principe

Le NGS nécessite une préparation d'échantillon optimale et soigneuse en amont du processus de séquençage pour assurer les meilleurs résultats possibles. Une vaste gamme de consommables de haute qualité et d'instruments précis pour effectuer toutes les étapes en amont du séquençage sont nécessaires, cela inclut l'extraction des acides nucléiques par des kits spécifiques à l'aide des automates, fragmentation et purifications de l'ADN génomique par des billes magnétiques. Les fragments d'ADN sont enrichis lors d'une première étape d'amplification ou de capture avant d'être séquencés chacun individuellement par des techniques diverses, spécifiques de chaque technologie. Il est possible de séquencer plusieurs échantillons d'ADN simultanément en les marquant par des bars codes d'identification qui seront reconnus par le séquenceur. Les séquences obtenues sont alignées au génome de référence par des algorithmes qui prennent en compte la fréquence de l'anomalie en terme de ratio allélique (nombre de bases mutées/nombre de lectures totales), la qualité des séquences qui portent les anomalies, et lorsqu'il est disponible, la présence de la même anomalie dans le génome constitutionnel. Enfin, l'étape de validation essentielle afin de classer les variants [54] [58].

Technique

Matériel

- Micropipette.
- Vortex.
- Centrifugation.
- Les consommables de la PCR.
- Le kit de l'extraction de l'ADN.
- Le kit de préparation de la librairie.
- Le séquenceur.
- Le kit de séquençage.
- L'automate de quantification.

Méthode

- À partir du bloc tissulaire paraffiné, une coupe micrométrique (5 à 10 μm) est effectuée et apposée sur lame de verre.
- En s'aidant d'une lame colorée par l'hémalun-éosine-safran (HES), le médecin pathologiste repère la zone tumorale. Ensuite la zone tissulaire d'intérêt est macro disséquée puis disposer dans un tube pour la micro centrifugation.
- L'extraction du matériel génétique se fait à l'aide des kits commerciaux.
- Les Etapes communes aux techniques du séquençage haut débit sont citées ci-dessous :
 - Préparation de librairie : L'ADN génomique est dans un premier temps fragmenté par sonication ou par méthodes enzymatiques, après de petits adaptateurs permettant la captation et la fixation ultérieure des molécules et sont ajoutés à chaque extrémité de chaque fragment d'ADN. L'échantillon peut alors être « enrichi » par capture des régions d'intérêt, en sélectionnant celles que l'on souhaite analyser.
 - Amplification clonale : Cette étape diffère souvent selon la technique de séquençage à « haut débit » il s'agit soit d'une amplification de l'ADN en émulsion au sein de microréacteurs ou en ponts sur phase solide.
 - Séquençage : Les molécules d'ADN ainsi amplifiées sont ensuite séquencées à l'aide de nucléotides réversibles. Des cycles successifs sont effectués, avec à chaque fois l'incorporation d'un désoxynucléotide triphosphate (dNTP) fluorescent réversible et bloqué. Une fois incorporé, le signal émis par le dNTP est détecté, puis le « bloqueur » et le groupement fluorescent sont clivés. La succession des cycles permet de déterminer la séquence de l'ensemble des molécules d'ADN.

Analyse bio-informatique : Les résultats bruts générés subissent plusieurs prétraitements par des méthodes statistiques et bio-informatiques pour l'exploitation des données génomiques de bonne qualité. Le pipeline d'analyse est constitué par le contrôle de la qualité, le nettoyage des séquences (reads), l'assemblage de novo ou alignement sur le génome de référence par mapping. [59] L'étape de l'analyse bio-informatiques est cruciale et permet d'extraire à partir des quantités élevées de données générées une information pertinente et utilisable sur le plan médical. Les séquences obtenues sont identifiées et comparés avec des séquences collectées dans les banques de données afin d'en déterminer la nature (simple polymorphisme, variation délétère) [55].

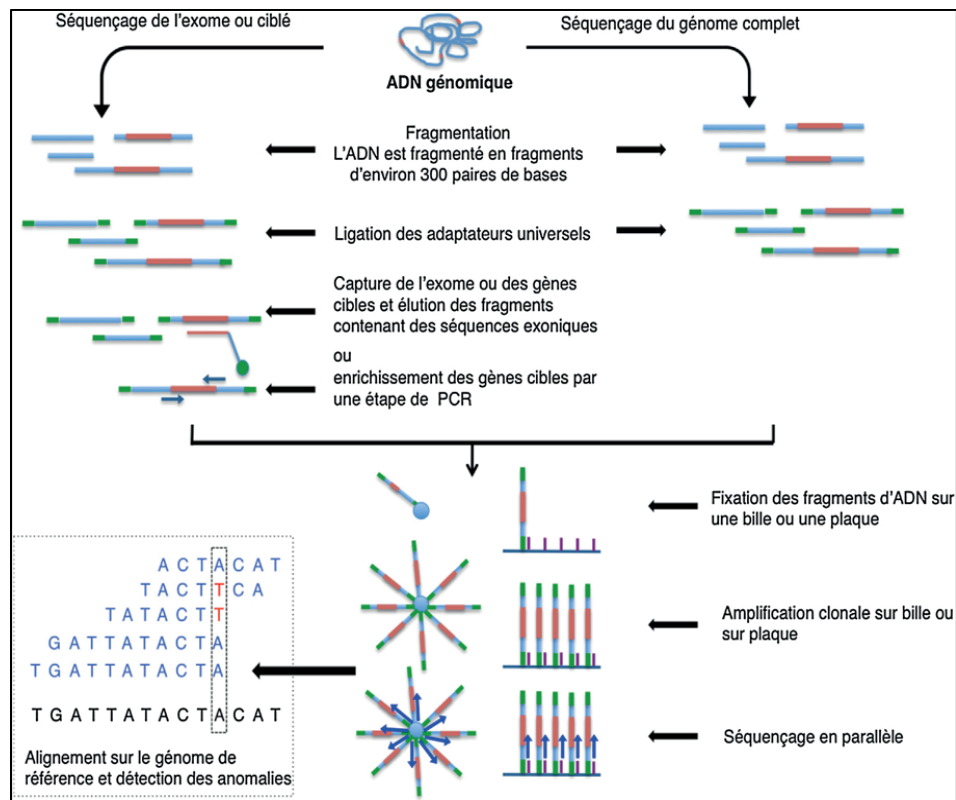


Figure 49 : Schéma résumant les différentes étapes du séquençage haut débit [57]

Le séquençage se fait par des techniques diverses et spécifiques, ci-dessous trois techniques :

Le pyroséquençage

Cette technologie est basée sur la détection du pyrophosphate lors de la réaction de polymérisation de l'ADN, après une fragmentation mécanique de l'ADN cible, des adaptateurs sont fixés à chaque extrémité des fragments à séquencer. Une étape d'amplification par une PCR émulsion est réalisée par l'incubation de ces fragments avec des billes. [60]

Principe

Le principe de pyroséquençage est la synthèse du brin complémentaire d'un ADN monobrin base par base en détectant à chaque étape l'activité de l'ADN polymérase par une réaction enzymatique de chimiluminescence. L'incorporation d'un nucléotide permet la libération d'un pyrophosphate transformé en ATP par l'ATP sulfurylase, utilisée pour la production d'un signal lumineux par un capteur, traduit sous forme d'un pic.

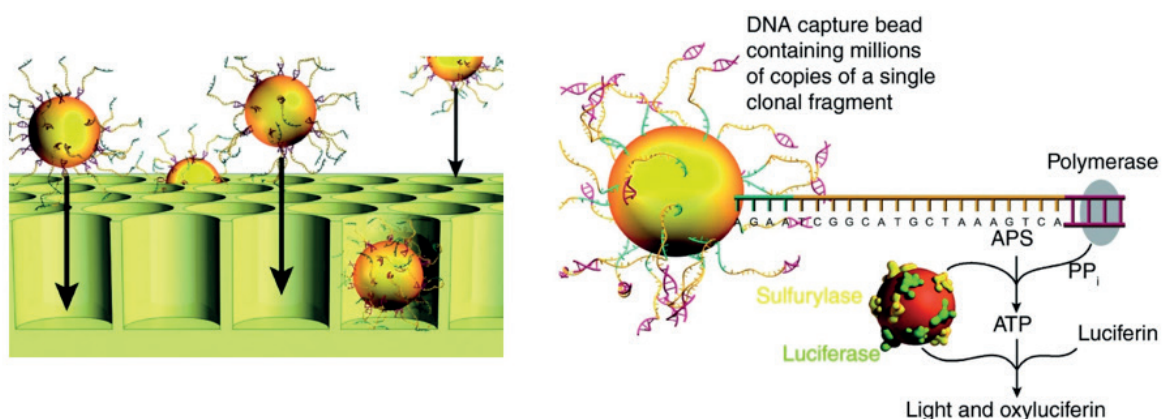


Figure 50 : Schéma simplifié de pyroséquençage [61]

- Le solexa d'illumina

La spécificité de cette technologie repose sur une amplification en pont des fragments à séquencer. Elle a lieu sur une surface appelée flow cell, divisée en huit lignes contiennent des oligonucléotides. Le séquençage illumina produit des reads de longueur moyenne de 100 à 250 paires de bases [61].

Principe

Le séquençage dans un système NGS illumina repose sur une méthode par synthèse. Pour cela, l'échantillon d'ADN à séquencer est tout d'abord fragmenté aléatoirement, des adaptateurs sont attachés à chaque extrémité. Ces fragments sont attachés à la flow cell qui contient des oligonucléotides capables de retenir les fragments d'ADN disposant d'un adaptateur complémentaire. Une fois, les fragments attachés aux flow cell, sont amplifiés par PCR bridge afin de créer plusieurs milliers de copies identiques de chaque fragment appelé cluster. Des amorces, des nucléotides sont ajoutés aux flow cell. Les amorces s'attachent alors sur les fragments d'ADN, qui peuvent être étendus par incorporation de nouveaux, à l'aide de l'ADN polymérase. Ces nucléotides sont identifiés par marqueur fluorescent unique. A chaque incorporation, la base ayant été ajoutée est déterminée en fonction de la longueur d'onde de son marqueur, détecté à l'aide d'un capteur.

- Nanopores

Ce séquençage met en jeu deux éléments :

- un nanopore d'origine protéique formant un tube de quelques nanomètres
- une membrane liquide synthétique polarisée.

Principe

Le séquençage débute par une fragmentation de l'ADN en larges fragments de 8-10 kb et sur la fixation d'un adaptateur à une extrémité de la molécule à séquencer. Cette séquence est fortement affine pour le pore et permet donc de diriger le fragment d'ADN vers le nanopore. Chaque base transitant au travers du pore crée une modification caractéristique de la polarité de la membrane, le suivi dans le temps des modifications de la membrane permet de déterminer la séquence nucléotidique [62].

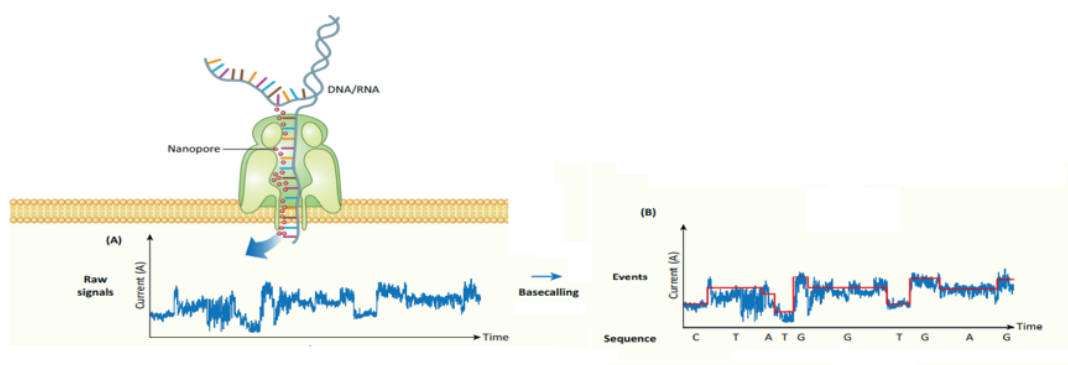


Figure 51 : Séquençage par nanopore d'oxford nanopore technologie [62]

Validation

L'étape de validation est essentielle afin de classer les variants :

- Somatiques (présents dans la tumeur uniquement), ce qui intéresse le pathologiste car la génétique constitutionnelle est le rôle uniquement des médecins généticiens.
- Prioriser le rapport des mutations qui sont une cible thérapeutique et les mutations qui ont un effet pathogénique certain par rapport aux variants polymorphiques présents dans la population générale et aux variants non pathogènes ou de signification inconnue.

Cette classification doit aider les cliniciens dans leur prise de décision.

Avantages et inconvénients de la NGS

Avantages

- la technique de NGS permet de détecter un nombre important d'anomalies moléculaires potentielles à partir d'une faible quantité d'ADN et en un temps court.
- Cette technique présente une sensibilité de détection supérieure aux techniques antérieures basées sur la PCR en temps réel ou le séquençage Sanger.

Limites

- Il s'agit d'une technique relativement coûteuse, qui nécessite des biologistes formés.
- L'interprétation des résultats bruts est également une étape importante et peut être longue



Chapitre 8

Digitalisation en anatomie et cytologie pathologique

- EL JIAR Mohammed
- CHRAÏBI Mariame

Digitalisation en anatomie et cytologie pathologique :

L'anatomie et cytologie pathologique (ACP) digitale est une évolution de la spécialité qui s'intègre dans l'ère du développement de l'intelligence artificielle. Elle consiste à visualiser les lames histologiques sur un système informatique numérique, d'une façon similaire au microscope optique. [54]

Le spectre des applications de la pathologie numérique en ACP est large et comprend le diagnostic primaire, le diagnostic peropératoire, la consultation ou la télépathologie, l'assurance qualité, l'archivage, l'éducation, les conférences et la recherche.

L'adoption généralisée des applications de pathologie numérique pourrait accélérer la consultation d'un deuxième avis qui peut être effectué en quelques heures contre des jours ou des semaines pour le cas des lames de verre. [55]

Il existe de nombreux avantages à cette digitalisation :

- Elle peut aider à améliorer la prise en charge anatomopathologique dans les zones mal desservies
- Faciliter la lecture des échantillons par des spécialistes qualifiés des autres laboratoires
- Réduire les coûts de stockage des lames
- Limiter la perte de lames
- Accélérer la récupération des lames et résoudre le problème de la décoloration des lames

Il existe cependant plusieurs défis dans la mise en œuvre généralisée de la pathologie numérique, notamment le coût et le manque de normalisation. À cela s'ajoute l'attitude potentiellement négative des pathologistes face au changement. [56]

Actuellement, de nombreux laboratoires d'ACP adoptent de plus en plus un concept digital total, intéressant toutes les étapes ; allant de la réception des prélèvements, passant par les différentes étapes techniques, et arrivant jusqu'au diagnostic et compte rendu avec zéro papier durant le processus.

L'imagerie de lame entière = Whole Slide Imaging (WSI) est désormais le principal moyen de capture d'images de pathologie numérique, bien que d'autres méthodes telles que les approches basées sur un champ de vision unique, par ex. un appareil photo numérique sur un microscope ou une vidéo en continu avec ou sans microscopie robotique, sont également considérés comme faisant partie de la pathologie numérique et peuvent être préférés pour des applications spécifiques. Voir figure 52.

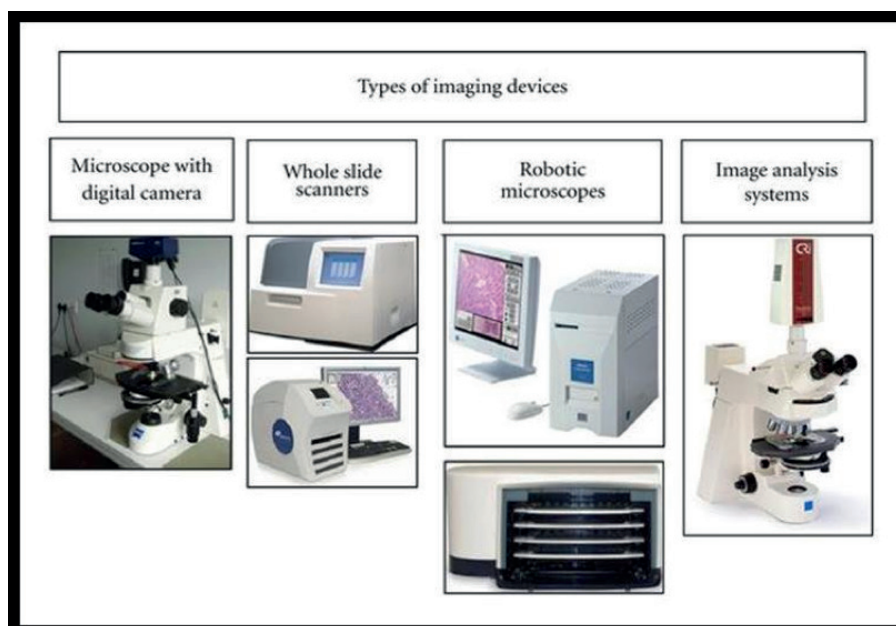


Figure 52 : Types de moyens d'imagerie utilisés en anatomie pathologique digitale [57]

Le déroulement et le protocole de pathologie digitale dépend essentiellement de son application et des ressources humaines et techniques du laboratoire. Il nécessite globalement, un moyen d'imagerie virtuelle (figure 52) (caméra, vidéo caméra, scanner de lames...), un outil informatique de visualisation et un site d'archivage (serveur, cloud ...). Voir figure 53.

Etapes de la digitalisation numérique :

La digitalisation numérique passe par trois grandes étapes, d'abord la réalisation de lames virtuelles, la validation et la visualisation et enfin le stockage. Voir Figure 53.

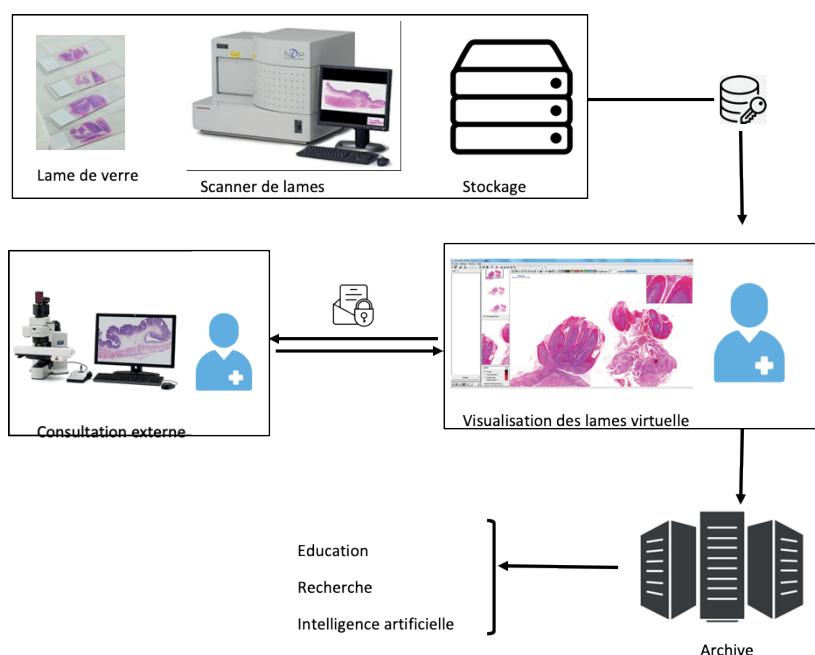


Figure 53 : Flux de travail simplifié en pathologie digitale.

Réalisation des lames virtuelles :

Les lames virtuelles sont créées à partir de lames de verre à l'aide de scanners spécialisés. Voir Figure 54. Toutes les numérisations de haute qualité doivent être exemptes de poussière, de rayures et d'autres obstructions. Il existe deux méthodes courantes pour la numérisation de diapositives numériques : la numérisation basée sur les mosaïques et la numérisation basée sur les lignes.

Les deux technologies utilisent une caméra intégrée et une platine motorisée pour déplacer la lame pendant que des parties du tissu sont imagées. Les scanners de mosaïques capturent des images à champ de vision carré couvrant toute la zone de tissu sur la lame, tandis que les scanners linéaires capturent des images du tissu en bandes longues et ininterrompues plutôt qu'en mosaïques. Dans les deux cas, le logiciel associé au scanner assemble les mosaïques ou les lignes en une seule image homogène. [58]



Figure 54 : Image d'un scanner de lames.

Validation et visualisation :

Les lames virtuelles sont accessibles pour être visualisées via un écran d'ordinateur et un logiciel de visualisation soit localement, soit à distance via Internet. Voir Figure 55.

Le rôle du pathologiste dans le flux de travail de pathologie digitale consiste à assurer la valeur et la qualité des données générées :

La valeur est définie par les connaissances techniques de la manipulation, de la fixation, du traitement et de la coloration des tissus, ainsi que l'expertise spécialisée.

La qualité repose sur la qualité du tissu, la lame histologique, la coloration et le scanner.

La validation des données d'analyse d'image peut être considérablement entravée par l'exécution d'une analyse sur des lames de tissu de faible qualité ou une coloration mal optimisée.

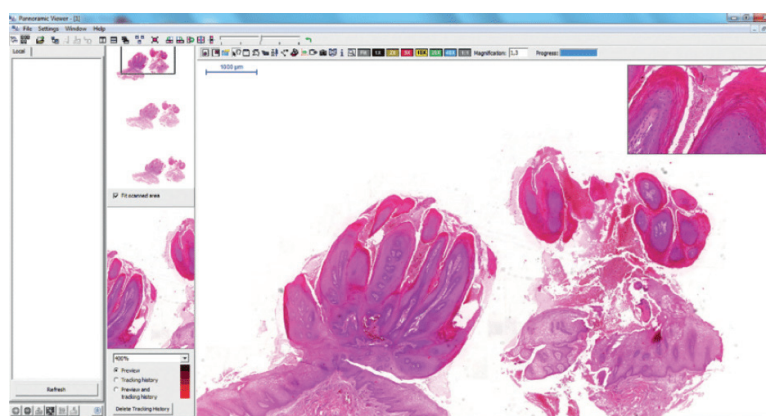


Figure 55 : Exemple d'un logiciel qui permet la visualisation des images histologiques virtuelles. [59]

Stockage :

Les lames virtuelles sont conservées dans un système de gestion de l'information qui permet l'archivage et la récupération intelligente. Ceci nécessite des serveurs de hautes capacités de stockage vu la grande taille des lames virtuelles qui atteignent en moyenne 1 à 2 GB par lame. [60]

La base des données réalisée permet de constituer une bio-banque virtuelle qui pourra être utilisée au niveau académique pour l'enseignement et également en matière de recherche notamment l'utilisation de l'intelligence artificielle.

La validation d'un flux de travail de microscopie digitale dans un environnement spécifique est importante pour garantir des performances diagnostiques élevées des pathologistes lors de l'évaluation d'images numériques des WSI.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour ce processus de validation. Le College of American Pathologists a publié une ligne directrice avec des exigences minimales pour la validation des systèmes d'imagerie de lames entières à des fins de diagnostic en pathologie humaine. [61]

Références

- [1] Cliniques universitaires SAIN LUC UCL bruxelles, Consignes de prélèvement et d'envoi des échantillons en Anatomie Pathologique, avril 2021.
- [2] Guide sur l'assurance qualité en anatomopathologie Phases pré-analytique et analytique Comité consultatif en anatomopathologie Novembre 2011.
- [3] Marion Amalfitano, Qifeng Dong, et Aissata Keita, Impact of the pre-analytical phase on the quality of samples collected in biobanks, Med Sci (Paris) 2020 ; 36 : 277.
- [4] Véronique Hofmana,b, Marius Iliea,b, Virginie Gavric-Tanga b, Virgine Lespinet b, Mireille Mari a , Sandra Lassallea,b, Catherine Butoria,b, Céline Coelle b, Olivier Bordone b, Eric Selva b, Aude Lamyc , Jean-Christophe Sabourinc , Paul Hofman. Rôle du lab.
- [5] France Gaëtan MacGrogan et al Recommandations du GEFPICS concernant la phase pré-analytique pour l'évaluation de HER2 et des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein : mise à jour 2014, Annales de pathologie (2014),.
- [6] Groupement des hôpitaux de l'institut Catholique de LILE, Manuel de prélèvement ACP JUILLET 2015 - VERSION 1.
- [7] Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique CHU TTA..
- [8] William E. Grizzle Models of Fixation and Tissue Processing, Biotech Histochem. 2009 October ; 84(5): 185–193. doi:10.3109/10520290903039052..
- [9] Manfred Dietel. Pre-Analytics of Pathological Specimens in Oncology. (eBook) DOI 10.1007/978-3-319-13957-9.
- [10] Véronique Marck. Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie Théorie et pratique, Laboratoire de pathologie Institut Curie, Paris, 2009.
- [11] Techniques d'anatomie et de cytologie pathologiques, Pathologie Cytologie et Développement durable (PCD), janvier 2015..
- [12] Les colorations histologiques: colorations de routine et colorations spéciales, Julie Hinsinger Plateforme d'Histologie – IRIC ; <http://www.u999.universite-paris-saclay.fr/images/stories/PDF/protocoles/Les%20colorations%20histologiques.pdf>..
- [13] Fiches techniques Bioimage His-Image – Auteur : Danielle MARTEL (IFTAB - PARIS) - Mise à jour juillet 2005..

- [14] Manual for Cytology , Manuals for Training in Cancer Control, Directorate General of Health Services Ministry of Health and Family Welfare Government of India November 2005..
- [15] Guide des bonnes pratiques de laboratoire en cytologie, association des cytologistes du Québec, sophie carbonneau et al,2014..
- [16] Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology, Pranab Dey,2017. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8>.
- [17] Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie Théorie et pratique, Véronique Marck Laboratoire de pathologie Institut Curie, Paris,2009..
- [18] ADOPTION DE LA CYTOLOGIE EN MILIEU LIQUIDE : ÉVALUATION TECHNOLOGIQUE, Technology Assessment Unit et Direction de l'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé, Juin 2008..
- [19] <https://www.clinisciences.com/achat/cat-coloration-pas-periodic-acid-schiff-3941.html>..
- [20] Fiches techniques Bioimage His-Image – Auteur : Danielle MARTEL (IFTAB - PARIS) - Mise à jour JUILLET 2007..
- [21] Coloration au bleu de toluidine, michèle crevecoeur, université de Genève..
- [22] Anatomie pathologique De Alan Stevens, James Lowe, Barbara Young, 2004..
- [23] Dictionnaire des sciences de la vie De Romaric Forêt, 2018..
- [24] Apport de la coloration de Ziehl Neelsen sur coupes histologiques dans le Diagnostic de tuberculose ganglionnaire, Sando, Z., Gonsu Kamga, H., Fewou, A., Kabeyene Okono, A., Ateba, G. R., Atangana, P. A., & Essame Oyono, J. L. (2015). HEALTH SCIENCES AND.
- [25] Oncologie de l'Œil et des Annexes atlas anatomo-clinique, De A. Brini, A. Dhermy, J. Sahel,1990..
- [26] Recommandations GEFPICS de l'HER2 dans le cancer du sein..
- [27] <https://www.aquaportail.com/definition-10566-immunofluorescence.html>.
- [28] GUIDE D'ANATOMOPATHOLOGIE, Ordre professionnel des technologistes médicaux du Québec (2014) ISBN : 978-2-9814023-3-2 (version PDF).
- [29] <https://www.medical-actu.com/cours/nephrologie/biopsie-renale-techniques/>.
- [30] L'Apport de l'immunofluorescence directe dans le diagnostic des dermatoses bulleuses, thèse pour l'obtention du doctorat en médecine (2018), Hicham OUASIF, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marrakech.
- [31] http://www.owlapps.net/owlapps_apps/articles?id=1810123.

- [32] Bontoux, C., Radford-Weiss, I., Romana, S., & Kaltenbach, S. (2018). Technique d'immunofluorescence et FISH combinées sur tissu fixé en formol et inclus en paraffine : application au lymphome de Hodgkin. *Morphologie*, 102(338), 157–158. doi:10.1016/j.morpho.
- [33] J. S. A. H. 2. Alice Boyez et 2.-1. doi:10.1684/hma.2017.1201.
- [34] Alamri, A., Nam, J. Y., & Blancato, J. K. (2017). Fluorescence In Situ Hybridization of Cells, Chromosomes, and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues. 1606, 265–279. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6>.
- [35] www.abnova.com.
- [36] <https://www.supagro.fr/ress-tice/PCR/1/co/definition.html>.
- [37] <https://fr.sawakinome.com/articles/science/difference-between-pcr-and-qpcr.html>.
- [38] Principe de l'amplification par PCR Ifremer–Décembre 2009 –v1 –Fiche réalisée pour Bibliomer et le centre de veille des produits aquatiques..
- [39] ADEME. Jean-Michel Monier et Sébastien Cécillon. 2015. Les outils de biologie moléculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollués – Synthèse. 39 pages..
- [40] <https://microbiologiemedicale.fr/biologie-moleculaire-amplification-genique-pcr-temps-reel/>.
- [41] «QPCR vs. PCR numérique vs. PCR traditionnelle». Thermo Fisher Scientific,.
- [42] <https://www.bertin-instruments.fr/preparation-echantillons-homogeneisateurs/application/extraction-adn/>.
- [43] <https://www.clinisciences.com/lire/qpcr-sybr-green-806/protocole-de-pcr-quantitative-qpcr-1182.html>.
- [44] Utilisation de la Q-PCR pour analyser des données de CHIP ou de MeDIP, ATELIER EPIGENETIQUE, Emmanuèle Mouchel-Vielh (juin 2012).
- [45] C. P. Stefan, & al. "Comparison of Illumina and Oxford Nanopore sequencing technologies for pathogen detection from clinical matrices using molecular inversion probes," *J. Mol. Diagnostics*, 2022, doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.12.005..
- [46] C. Hamard et al., "IHC, FISH, CISH, NGS in non-small cell lung cancer: What changes in the biomarker era?" *Rev. Pneumol. Clin.*, vol. 74, no. 5, pp. 327–338, 2018, doi: 10.1016/j.pneumo.2018.09.013..
- [47] M. J. Rodrigues et C. Gomez-Roca, « Place des technologies de séquençage haut débit en oncologie », *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 100, no 3, p. 295 301, mars 2013, doi: 10.1684/bdc.2013.1717..
- [48] J. Shendure and H. Ji, "Next-generation DNA sequencing," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 10, pp. 1135–1145, 2008, doi: 10.1038/nbt1486..

- [49] G. R. Oliver, S. N. Hart, and E. W. Klee, "Bioinformatics for clinical next generation sequencing," *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 124–135, 2015, doi: 10.1373/clinchem.2014.224360..
- [50] N. Piton, A. Lamy, et J.-C. Sabourin, « Séquençage des tumeurs: évolutions et révolutions », *Cancer/Radiothérapie*, vol. 21, no 6 7, p. 580 583, oct. 2017, doi: 10.1016/j.canrad.2017.07.022..
- [51] L. Liu et al., "Comparison of next-generation sequencing systems," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/251364..
- [52] S. E. Levy and B. E. Boone, "Next-generation sequencing strategies," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 9, no. 7, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1101/cshperspect.a025791..
- [53] Y. K. Wan, C. Hendra, P. N. Pratanwanich, and J. Göke, "Beyond sequencing: machine learning algorithms extract biology hidden in Nanopore signal data," *Trends Genet.*, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1016/j.tig.2021.09.001..
- [54] «Betmouni S. Diagnostic digital pathology implementation: Learning from the digital health experience. DIGITAL HEALTH. January 2021. doi:10.1177/20552076211020240».
- [55] «Luo, W., Hassell, L.A. (2016). Use Cases for Digital Pathology. In: Kaplan, K., Rao, L. (eds) Digital Pathology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20379-9_2».
- [56] «Bellis M, Metias S, Naugler C, Pollett A, Jothy S, Yousef GM. Digital pathology: Attitudes and practices in the Canadian pathology community. *J Pathol Inform* 2013;4:3.».
- [57] «Dwivedi, Sandeep & Swamy, Madhu & Dubey, Amita & Verma, Yamini. (2019). The advent of digital pathology: A depth review. *JOURNAL OF ENTOMOLOGY AND ZOOLOGY STUDIES*. 7. 43-49.».
- [58] «Fathima S, Parwani A. WSI fundamentals. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/informaticswholeslidefund.html>. Accessed April 12th, 2022.».
- [59] «Fernandes, Carla & Bonan et al. (2018). Dental Students' Perceptions and Performance in Use of Conventional and Virtual Microscopy in Oral Pathology. *Journal of Dental Education*.».
- [60] «Romero Lauro G, Cable W, Lesniak A, et al. Digital pathology consultations-a new era in digital imaging, challenges and practical applications. *J Digit Imaging*. 2013;26(4):668-677. doi:10.1007/s10278-013-9572-0».
- [61] «Bertram CA, Stathonikos N, Donovan TA, et al. Validation of digital microscopy: Review of validation methods and sources of bias. *Vet Pathol*. 2022;59(1):26-38. doi:10.1177/03009858211040476».

Index

A

Acétone : 69, 70
 Acheminement: 20, 21, 22, 23
 Acide : 26, 27
 ADN : 6, 74, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87
 ARN : 74
 Alcool : 19, 28, 31, 34, 35, 36, 42, 43, 44
 Analyse moléculaire : 73
 Anticorps : 67, 69, 70, 71, 74, 79
 Antigène : 67, 70, 71
 Amorce : 78, 81, 86
 Amplification : 79, 82, 81
 Appareil de circulation : 5
 ARN : 74
 Autopsie : 17
 Automate : 31
 Azote liquide : 69, 70

B

Bain marie : 8, 30
 Bio-banque virtuelle : 91
 Biologie moléculaire : 16, 24, 43, 68, 73, 74, 87
 Biopsie : 5, 14, 17, 22, 23, 25, 68, 69, 70
 Bleu trypan : 40
 Bleu Alcian : 49
 Bleu de toluidine : 50
 Bloc : 20, 29, 30, 43, 37
 Boite de pétri : 38

C

Carboglace : 69
 Carotte biopsique : 27
 Cassette : 23, 29
 Cellules : 18
 Centrifugation : 5, 38, 40, 42, 43
 Colle caoutchouc : 31, 76
 Coloration : 5, 20, 30, 36, 38, 42, 43, 44, 45, 47, 64, 67
 Coloration complémentaire : 20
 Coloration histologique : 31
 Coloration standard : 20, 30
 Contrôle : 68, 70
 Compte rendu : 17, 23
 Coupe : 5, 6, 29, 30, 43
 Coupe histologie : 6
 Cryostat : 68, 69, 70
 Cytobloc : 43
 Cytocentrifugation : 37, 41, 42
 Cytogénétique : 73
 Cytologie : 5, 18, 22, 33, 34, 36, 37, 42
 Cytologie conventionnelle : 19
 Cytologie en couche mince : 19
 Cytologie exfoliative : 18
 Cytologie de brossage : 18
 Cytologie de ponction : 18
 Cytométrie en flux : 42
 Cytoponction : 5, 35, 43

D

DAPI : 76, 77
Dénaturation : 76, 78, 81
Déparaffinage : 76
Déshydratation : 28, 76
Digitalisation: 89

E

Echantillon : 15, 16
Echantillonnage : 23
EDTA : 36
Enregistrement : 20, 21, 22
Enrobage : 20, 28, 29
Etat frais : 16, 17, 18
Ethanol : 34, 36, 43, 76, 77
Etiquette : 22
Etude : 30, 61
Etude cytologique : 17
Etude macroscopique : 23, 26
Etude microscopique : 18
Examen : 17, 17, 22
Examen extemporané : 17
Examen macroscopique : 20
Exérèse chirurgicale : 15
Extraction : 80, 84

F

FISH : 6, 74, 75, 76, 77
Fiche de suivi : 21
Fixateur : 15, 16, 17, 18, 19, 23, 24
Fixation : 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 34, 36, 37, 43, 19, 7, 5, 6
Flacon : 14, 16, 18, 19, 23
Formol: 16, 17, 22, 23, 24, 28
Fragment tissulaire : 17
Frottis : 34, 36, 37, 38, 42, 5
Frottis cytologique : 14
Fluorochrome : 68, 69, 70, 74, 77
Fluorescéine : 71
Fluorophore: 74

G

Gène: 74
Glycérinetamponnée: 69, 70
Gorocott: 58

H

HE : 8, 30
HES : 8, 30, 84
Hématéine-éosine : 71
Histologie : 30
Histoenzymologie : 17
Hybridation : 74, 75, 76, 77, 78

I

Illumina : 86
 Inclusion : 17, 20
 Immuno-histochimie : 6, 8, 16, 24, 43
 Immunofluorescence (IF) : 6, 8, 17, 43, 66, 67, 68, 69, 70, 71,
 Imprégnation : 28
 Intervention chirurgicale : 15
 Ischémie chaude : 15
 Ischémie froide : 15

L

Laboratoire d'ACP : 14, 16, 17, 20, 22, 23
 Lame virtuelle : 91
 Lecture : 14, 17, 20
 Liquide de Michel : 70
 Librairie : 83

M

Malassez : 40
 Marqueur : 74
 Matrice : 78, 79, 80, 81
 Méthanol : 36
 MGG : 6, 7, 8, 41, 44, 45, 56
 Microscope : 55, 60
 Microscope à fluorescence : 67, 76, 77
 Microscope à UV : 69, 71
 Microtome : 5, 30
 Milieu de préservation de Michel : 17
 Milieu liquide : 19
 Mutation : 74
 Mutation somatique : 73
 Montage : 31, 43, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 61, 62, 68, 69, 76
 Morphologie tissulaire : 17

N

Nanopore : 86
 NGS : 83, 86, 87

P

Papanicolaou : 7, 34, 36, 38, 41, 42, 43, 45,
 Paraffine : 5, 8, 17, 28, 29, 42, 75, 76
 Para-phenylenediamine : 71
 PAS : 5, 8, 41, 47
 Pathologie : 17
 Pathologiste : 17, 23, 25
 Patient : 14, 17
 PBS : 69, 70
 PCR : 6, 7, 8, 78, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87
 Perls : 5, 41, 52
 Pièce opératoires : 14, 16, 22, 23, 24, 25, 27
 Ponctions : 14
 Porte lames : 19
 Prélèvements : 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 30
 Prélèvement biopsiques : 16
 Prélèvements cytologiques : 18, 19
 Prélèvement histologique : 16
 Prélèvement tissulaire : 15, 28
 Prélèvement urgent : 17
 Préparation tissulaire : 16
 Procédure : 22, 23
 Protéase : 76
 Protéine fluorescente : 67
 Protocole : 23, 27, 28
 Purification : 80
 Pyroséquençage : 85

Q

qPCR : 78, 79, 80, 81, 82

R

Réception : 16, 20, 21, 22, 23

Réceptient : 16, 21, 22, 26

Réhydratation : 76

Réticuline : 57

Rhodamine : 71

Rouge congo : 5, 51

Rouge Sirius : 54

S

Scanner de lame : 89, 90, 91

Score de golde : 41, 5

Séquence : 74

Séquençage : 83, 84, 86

Serveur de stockage : 91

Sonde : 74, 75, 81

Solution pp (permanganate de potassium) : 76

Solution SSC : 76

Spray fixateur : 19

Sulfate d'ammonium : 70

T

Table de macroscopie : 5, 23

Tampon : 69, 70, 71

Technique millipore : 37, 42

Tissu : 15, 16, 23, 26, 28, 31

Tissutek : 69

Toluène : 29, 31, 43

Translocation : 75


Trichrome de masson : 48

X

Xylène : 76, 77

Lexique

ACP : Anatomie et cytologie Pathologique
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AFAQAP : Association Française D'assurance Qualité En Anatomie Et Cytologie Pathologique
ARN : Acide Ribonucléique
BM : Bain Mari
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DAB : 3,3'- Diaminobenzidine
DAPI : 4',6-Diamido-2-Phénylindole (A Verifier Page 76)
Dntp :Désoxynucléotide Triphosphate
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
Fig : Figure
FISH : Hybridation In Situ Fluorescente
GEFPICS : Groupe D'étude Des Facteurs Pronostiques Immunohistochimiques Dans Le Cancer Du Sein
HE : Hématoxyline-Eosine
HES :Hématoxyline, Éosine, Safran
HER2 : Human Epidermal Growt Factor Receptor2
Hcl : Acide Chloridrique
HRP : Horseradish Peroxidase
Ig : Immunoglobuline
Igg : Immunoglobuline G,
Igm : Immunoglobuline M
Iga : Immunoglobuline A
IF :Immunofluorescence
IFD : Immunofluorescence Direct
IHC : Immunohistochimie
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LCR : Liquide Céphalorachidien
MGG : May Grunwald Giemsa
MG : May Grunwald
M. Leprae : Mycobactérium Leprae
NGS : Séquençage Nouvelle Génération
PH : Potentiel Hydrogène
PCD : Pathologie Cytologie Et Développement Durable
PAS :Periodic Acid Schiff
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR :Polymerase Chain Reaction
PP : Paraffine préchauffée
QPCR :PCR En Temps Réel
TTA :Tanger-Tétouan-Al Hoceima
T° : Température
TA : Température Ambiante
UV : Ultraviolet



Ce manuel technique élaboré par l'équipe du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique (ACP) du CHU TTA, résume le circuit des prélèvements en ACP et décrit les différentes techniques en allant de la technique standard jusqu'aux techniques de Biologie moléculaire suivant des objectifs pédagogiques clairs.

Ce manuel s'inscrit dans un programme de qualité pour améliorer et assurer la fiabilité des résultats des comptes rendu en anatomie et cytologie pathologique.

Ce livre s'adresse aux techniciens, étudiants de Médecine, résidents, pathologistes et aux cliniciens.