



Université Sidi Mohamed Ben Abdallah



Faculté des sciences et techniques de Fès
Département Biologie

**Licence science et technique (LST)
Biologie & Santé**

Rapport de projet de fin d'étude

Immunohistochimie en pathologie cancéreuse

Réalisé par :

Berrada Ghita

Encadré par :

Mme Karima Mikou

Mme Amarti Afaf

Soutenu Le 12 Juin 2014 devant le jury composé de:

Mme Karima Mikou

Mme Amarti Afaf

Mr. TAZI Abdelali

Année universitaire : 2013-2014

Dédicace

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

A mes sœurs, pour leur dévouement et leur encouragement.

Aux membres de ma famille pour leur disponibilité

A tous mes professeurs, pour leurs efforts et leurs conseils

A mes amis, pour leur aide et leur fidélité.

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



Remerciements

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

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

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

Merci à tous le corps professoral de la F ST –Fès et à tous les agents du CHU HASSAN II qui ont contribué directement ou indirectement à l'aboutissement de mon projet.

Je tiens également à remercier Mr Tazi d'avoir accepté de juger mon travail.

Enfin, je ne peux pas clôturer cette page de remerciement sans évoquer mes parents, mes sœurs, mes amis et tous ceux qui, de près ou de loin, j'ai passé ces dernières années, je leur suis très redevable.

Merci

Liste des figures

Figure 1 : Inclusion des fragments dans les cassettes.

Figure 2 : Histokinette, Automate permettant l'inclusion des échantillons fixés dans de la paraffine après déshydratation.

Figure 3: appareil d'enrobage (ou d'inclusion) dans la paraffine.

Figure 4: Microtomie.

Figure 5: Lames montées et colorées.

Figure 6 : répartition selon le type de prélèvement.

Figure 7 : Répartition des cas de cancers du sein en fonction de l'âge.

Figure 8: Répartition des grades histologiques des tumeurs mammaires.

Figure 9: Répartition des scores de Her2 chez les patientes.

Figure 10: Cancer du sein HER2 score 1.

Figure 11 : Cancer du sein HER2 score 3 en immunohistochimie.

Figure 12 : Résultats de Ki 67.

Figure 13 : Pourcentage des patientes présentant des récepteurs oestrogénique(RO).

Figure 14 : Cancer du sein RO positif en immunohistochimie.

Liste des tableaux

Tableau 1: les stades du cancer du sein

Tableau 2 : les grades du cancer du sein

Tableau 3: score Her2 selon les recommandations de l'ASCO.

Liste des abréviations

CHU : centre hospitalier universitaire.

IHC : Immun histochimie.

VPH : virus du papillome humain.

Ac : anticorps.

Ag : antigène.

CEA : Antigène carcino-embryonnaire.

HES: hémateïne / éosine /safran.

Her2: human epidermal growth factor receptor 2.

RO : Récepteur ostrogénique.

RP : Récepteur progestatifs.

Système TNM : Tumour Nodes Metastases (tumeur, ganglions, métastases).

PBS : Phosphate-buffered saline.

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL	2
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- Les pathologies cancéreuses	3
1-Définition	3
2-Groupes de cancer	3
3-Causes	4
4-Diagnostic	4
5-Traitement et Prévention	5
5.1- la chirurgie	5
5.2- la radiothérapie	5
5.3- la chimiothérapie	6
II- Le cancer de sein	6
III- L'immunohistochimie	8
1-Définition de la technique	8
2-Principe de la technique	9
3-Les anticorps utilisés	10
4- Apport de l'immunohistochimie dans le diagnostic des cancers	11
5-Application et limitation de la technique	11
6-Avantages et inconvénients de la technique	12
PARTIE PRATIQUE	13
I- Matériel	13
II- Méthode expérimentale	13
1-Examen histologique sur tissu fixé	13
1.1- La fixation	14
1.2-L'inclusion	15
1.3-Réalisation des coupes ou microtomie	16
1.4-Coloration	16
1.4.1-Déparaffinage :	17
1.4.2-Hydratation :	17
1.5- Le montage	18
2-Etude immun histochimique.	18
2.1-Détection des récepteurs hormonaux, des cytokératines et du Ki-67	18
2.2-Détection de l'oncoprotéine Her2 :	19
3-Lecture des lames après immunohistochimie.	
RÉSULTATS ET DISCUSSION	
A- Résultats	21
I- Résultats de l'étude histologique.	21
1- répartition selon le type de prélèvement	21
2- Répartition des cas de cancer en fonction de l'âge	21
3- Répartition des grades du cancer de sein	22

II- Résultats immunohistochimique.	23
1-répartition selon le score de Her2	23
2-Résultats de Ki-67	24
3-Résultats des RO (récepteurs ostrogéniques).	25
B- Discussion	27
CONCLUSION	29
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	30

Introduction générale

Le cancer désigne tout type de tumeur maligne qui a une évolution rapide pouvant causer l'atteinte du reste de l'organisme. C'est une maladie qui se caractérise par une multiplication anarchique et anormalement élevée de cellules au sein d'un organe ou d'un tissu du corps humain. Les cellules prolifèrent à l'infini et sont responsables de la formation de masses appelées tumeurs. La maladie peut toucher presque n'importe quel organe du corps, de la peau au côlon.

Il existe plus de 100 différents types de cancer. Les cancers les plus fréquemment rencontrés sont le cancer du poumon, le cancer du sein et le cancer de la prostate.

Le diagnostic de ces maladies cancéreuses, exige toujours une biopsie et un examen anatomopathologique de type histologique. Cet examen basé sur l'inclusion en paraffine, permet en série d'étapes d'obtenir un résultat, et de l'interpréter.

Les méthodes d'analyse réalisées par les pathologistes font appel à différentes techniques complémentaires à savoir :

- un examen macroscopique, c'est-à-dire un examen à l'œil nu, des prélèvements et des pièces opératoires, tous confiés au laboratoire d'anatomopathologie, permettant de donner une description de la tumeur (taille, contour, couleur...).

- un examen histologique ou cytologique réalisé au microscope permettant de déterminer le stade histologique de la tumeur.

- l'immunohistochimie qui est une technique de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. Elle exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques. Cette technique est largement utilisée pour le diagnostic et/ou le suivi de cancers notamment le cancer de sein.

Mon travail, réalisé au centre hospitalier Hassan II de Fès, au service d'anatomopathologie durant une période de 2 mois, a porté sur l'apport de cette technique de l'immunohistochimie (IHC) dans le diagnostic et le traitement du cancer du sein. On s'est intéressée à la détection des récepteurs hormonaux notamment les récepteurs oestrogéniques (RE) et progestatifs (RP) ; ces deux hormones étant largement impliquées dans la pathologie cancéreuse du sein, l'inhibition de leur sécrétion est envisagée pour le traitement des patientes positives. On s'est également intéressée à la détection du Her2, protéine surexprimée dans

certaines cancers de sein et enfin à l'expression de l'antigène Ki-67 : un marqueur de prolifération.

Présentation de la structure d'accueil

Avant d'aborder le thème de mon mémoire, il convient tout d'abord de présenter le CHU Hassan II, lieu de mon stage de fin d'étude.

Le centre hospitalier Hassan II a été inauguré par SM le Roi Mohammed VI en 2009 à Fès. Il est placé sous la tutelle du ministère de la santé et a pour mission de dispenser des soins médicaux, conduire des travaux de recherche médicale, de participer à l'enseignement clinique universitaire et postuniversitaire médical et pharmaceutique ainsi qu'à la formation du personnel paramédical.

Au sein du CHU On trouve le Laboratoire Central d'Analyses Médicales qui est situé au bâtiment **J**. Ce laboratoire est conçu comme un pôle d'activités hospitalières comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales. Il se compose d'une salle de réception, d'une salle de prélèvements, d'un service d'anatomopathologie ainsi que de plusieurs autres services (biochimie/pharmacotoxicologie, hématologie, bactériologie/immunologie, génétique médicale et biologie moléculaire, parasitologie).

Le service d'anatomie pathologie où j'ai effectué mon stage est un service clé du laboratoire. Il traite essentiellement les pathologies mammaires et gynécologiques, thyroïdiennes, urologiques, cutanées (mélanome), pulmonaires, digestives et de l'appareil locomoteur (os et tissus mous). Il se charge des prélèvements de pièces opératoires, de biopsies et de frottis cytologiques en utilisant des techniques telles (l'immunohistochimie, l'inclusion, la microtomie) afin de donner les facteurs pronostiques.

Ce service est doté de plusieurs machines utilisées par environ 8 techniciens.

I- Les pathologies cancéreuses

1-Définition

La pathologie cancéreuse ou « Cancer » est un terme général désignant une maladie pour laquelle certaines cellules de l'organisme adoptent un comportement anormal caractérisé par :

- une indépendance vis-à-vis des signaux qui stimulent normalement la multiplication des cellules ;
- une insensibilité aux signaux et mécanismes antiprolifératifs ;
- une capacité proliférative qui n'est plus limitée (croissance à l'infini) ;
- la disparition du phénomène d'apoptose ;
- une capacité anormale à susciter l'angiogenèse ;
- et l'acquisition d'un pouvoir invasif et de production de métastases.

2-Groupes de cancer

On distingue 4 principaux groupes de cancers :

- les **carcinomes** sont les tumeurs qui prennent naissance dans le revêtement extérieur ou intérieur des organes internes (appelé *tissu épithélial*) et sur la surface extérieure du corps;
- les **leucémies** sont les cancers des éléments constitutifs du sang;
- les **lymphomes** sont les tumeurs qui se forment dans le système lymphatique;
- les **sarcomes** sont les tumeurs qui prennent naissance dans le tissu conjonctif, comme les muscles, les os et le cartilage.

3-Causes

On ignore la cause exacte du cancer, mais différents facteurs peuvent jouer un rôle dans ce processus. La majorité des formes de cancer sont causées par des mutations génétiques de cellules qui se produisent pendant la vie d'une personne, sous l'influence de facteurs environnementaux comme l'usage du tabac ou l'exposition à la radiation. Parmi les facteurs environnementaux susceptibles de causer un cancer :

-Le tabagisme: cause le cancer du poumon ; il est aussi associé à un plus grand risque de cancer de la bouche, du larynx, de l'œsophage, de la vessie et du col de l'utérus.

-Des substances chimiques : l'exposition aux colorants industriels, à l'amiante et au benzène est associée au cancer.

-Un rayonnement ionisant : le lien entre le rayonnement ionisant et le cancer a déjà été établi, mais on ignore quelle quantité de rayonnement pourrait augmenter le risque de cancer.

-Un virus: certains virus, comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH, responsable du sida), sont associés à un plus grand risque de cancer du foie, de lymphomes et de sarcomes. Le virus du papillome humain (VPH, qui cause les condylomes acuminés) est associé à une augmentation du risque du cancer de la bouche, de l'anus et du col de l'utérus.

-Les rayons du soleil: une exposition prolongée (par ex. le bronzage) provoque des lésions cutanées et peut entraîner un cancer de la peau.

4-Diagnostic

Pour poser le diagnostic, les spécialistes du cancer ou oncologues évaluent les symptômes, effectuent un examen physique et demandent des analyses de sang ainsi que des radiographies. La seule façon permettant de déterminer avec certitude si les cellules sont cancéreuses consiste à prélever un échantillon de tissu contenant ces cellules, processus qu'on appelle biopsie. Le personnel de laboratoire examine alors les cellules au microscope, et les

informations obtenues à partir de la biopsie permettent au médecin de dire quel est le type et le stade du cancer.

Au moment du diagnostic, la détermination du stade du cancer aide à définir le pronostic et le type de traitement qu'un patient va recevoir. On utilise un système de classification des cancers, appelé le système TNM, qui décrit la taille de l'infiltration de la tumeur, l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases.

5-Traitement et Prévention

On peut prévenir certains types de cancer grâce à des modifications des habitudes de vie : c'est la prévention primaire du cancer. Les cancers liés à l'usage du tabac (par ex. le cancer du poumon) représentent presque un tiers de toutes les formes de cancer mortel. Par conséquent, cesser de fumer serait une étape essentielle pour prévenir les cancers de la bouche, de la gorge, de l'œsophage et du poumon. En évitant de s'exposer au soleil et en limitant la durée de l'exposition ainsi qu'en utilisant une protection adéquate (écran solaire) lorsqu'on est au soleil, on pourra réduire le risque de cancer de la peau. L'alimentation est un autre facteur important dans la prévention du cancer : un régime riche en matières grasses est associé à un risque plus élevé de certains cancers (comme le cancer du sein et le cancer de la prostate), alors qu'un régime riche en fibres est connu pour sa capacité à réduire le risque de cancer du côlon.

Pour traiter le cancer, on fait appel à la chirurgie, à la radiothérapie, à la chimiothérapie et, pour certaines formes de cancer, aux hormones ou aux médicaments bloquant la sécrétion hormonale. Le traitement du cancer vise à tuer les cellules cancéreuses en évitant, autant que possible, de détruire les cellules saines.

5.1- la chirurgie

La chirurgie permet d'enlever les cellules cancéreuses qui sont regroupées ensemble. De nombreux cancers sont traités par chirurgie. Les chirurgiens enlèvent également les cellules normales entourant les cellules cancéreuses ou la tumeur, afin de déterminer si le cancer s'est propagé ou non. Lorsque le cancer s'est déjà propagé, il est très difficile d'enlever les cellules cancéreuses à l'aide de la chirurgie.

5.2- la radiothérapie

La radiothérapie permet de traiter les cancers localisés. Elle peut prendre différentes formes. On peut diriger un faisceau de rayonnement sur la peau près du site du cancer. Le rayonnement tue les cellules cancéreuses mais, malheureusement, il détruit aussi les cellules saines. Des appareils récemment conçus permettent de mieux concentrer le rayonnement sur les cellules cancéreuses et d'éviter les cellules saines. On peut aussi injecter des particules radioactives dans le sang. Ces particules adhèrent aux cellules cancéreuses mais non à celles qui sont normales. Il arrive aussi qu'on introduise des particules radioactives dans un organe, près du cancer, transmettant aux cellules cancéreuses une dose de rayonnement.

5.3- la chimiothérapie

Dans la chimiothérapie, on fait appel à des médicaments anticancéreux. Elle est fréquemment utilisée lorsque le cancer s'est propagé à plusieurs régions du corps. Pour beaucoup de cancers, on utilise une combinaison de médicaments car les résultats sont meilleurs qu'avec un seul médicament. On parle d'une réponse complète à la chimiothérapie lorsqu'aucune trace de cancer ne peut être décelée. Cependant, certaines cellules cancéreuses peuvent demeurer dans le corps sans être détectées. Par conséquent, le cancer peut réapparaître après une période de rémission. Dans une réponse partielle, la taille du cancer diminue de plus de 50 %. Malheureusement, beaucoup de cancers deviennent résistants aux médicaments anticancéreux. Ces médicaments affectent à un certain point la mitose ou la fonction de l'ADN. Certains cancers (comme le cancer du sein) réagissent aux actions hormonales, et l'on peut alors utiliser des hormones ou des médicaments bloquant l'action hormonale pour ralentir la croissance cancéreuse.

II-Le cancer de sein

Le cancer du sein est une tumeur maligne de la glande mammaire. C'est un cancer qui naît dans les unités cellulaires dont la fonction est de sécréter le lait, les unités ducto-lobulaires du sein, essentiellement chez la femme.

Il existe différents types de cancers du sein, les adénocarcinomes étant les plus courants (95 %). Les cancers du sein se développent à partir des canaux (cancers canaux) et des lobules (cancers lobulaires) de la glande mammaire. Ils sont dits « *in situ* » lorsque les cellules cancéreuses sont confinées aux canaux et lobules, et « infiltrant » lorsque les cellules cancéreuses sont présentes dans les tissus qui les entourent. Dans ce dernier cas, les cellules

malignes se propagent éventuellement dans les ganglions situés sous les bras (ganglions axillaires) et dans l'organisme. Le cancer du sein peut survenir aussi chez l'homme, mais il est rare (environ 200 fois moins fréquent que chez la femme) .

Tous les cancers du sein n'ont pas la même agressivité, une fois que tous les tests nécessaires ont conduit à un diagnostic confirmé et précis de cancer du sein, il faut ensuite déterminer la stadification et le grade de la maladie. Il est essentiel de connaître le stade et le grade d'un cancer du sein, car c'est ce qui aidera à choisir le traitement qui conviendra le mieux:

- La stadification consiste à définir la taille de la tumeur et à vérifier si elle s'est développée à l'extérieur du sein, dans d'autres parties du corps. Il existe 5 stades au cancer du sein, de 0 à 4. Ces différents stades sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau1: les stades du cancer du sein

LES 5 STADES DU CANCER DU SEIN	
Stade	Description
0	Les cellules cancéreuses sont localisées seulement dans la membrane d'un canal galactophore (cancer dit carcinome canalaire in situ) ou dans la membrane d'un lobule (cancer dit carcinome lobulaire in situ).
1	La taille de la tumeur cancéreuse est de 2 centimètres ou moins et le cancer ne s'est pas propagé à l'extérieur du sein.
2	La taille de la tumeur est de 2 à 5 centimètres, ou alors le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques voisins, ou encore ces 2 situations sont réunies.
3	Le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques et possiblement aux tissus voisins, par exemple à des muscles ou à la peau.
4	Le cancer s'est propagé à d'autres parties du corps.

- Le grade (classification histologique) est le niveau d'évolution prévu de la maladie, qu'on peut établir d'après l'analyse de l'apparence et du comportement des cellules cancéreuses par rapport à des cellules normales. Il existe 3 grades du cancer du sein. Les caractéristiques de ces grades sont données dans le tableau 2.

Tableau 2 : les grades du cancer du sein

LES 3 GRADES DU CANCER DU SEIN.	
Grade	Description
1	Grade bas : la croissance est lente, et les risques de propagation sont moins élevés.
2	Grade modéré : la croissance et le risque sont moyens.
3	Grade haut : la croissance est plutôt rapide, et les risques de propagation sont plus élevés.

Pour un choix meilleur du traitement, plusieurs techniques qui permettent de donner plus d'information sur la tumeur sont utilisées. Parmi ces techniques, la technique d'immunohistochimie est largement employée dans la pathologie cancéreuse et en particulier dans le cancer de sein ; cette technique permet une meilleure prise en charge des patientes.

III-L'immunohistochimie

1-Définition de la technique

L'Immunohistochimie est une Technique associant l'immunologie et l'histochimie, elle permet de localiser et d'identifier des protéines.

Le domaine d'application est très vaste en Anatomie et cytologie pathologie étudiant les tissus présentant des altérations lésionnelles. Cette technique apporte une aide au diagnostic en pathologie tumorale et non tumorale, une aide à l'établissement du pronostic en pathologie tumorale. elle est utilisée de façon journalière dans les laboratoires et connaît un développement accru par l'apparition de méthodes de démasquage antigénique, la commercialisation de nombreux anticorps intéressant des domaines très variés et de systèmes d'amplifications de plus en plus performants, permettant de révéler de beaucoup plus faibles

quantités d'antigène et ce, après traitement classique de cellules ou tissus par fixation et inclusion en paraffine.

Cet important développement élargit le domaine de la recherche dans l'étude des mécanismes physiopathologiques des maladies en pathologies humaines et expérimentales.

2-Principe de la technique

Le but de l'immunohistochimie est de mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'une réaction antigène – anticorps, le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré.

Le réactif principal est un anticorps spécifiquement dirigé contre ce motif. Un traceur fixé directement ou indirectement sur l'anticorps permet de détecter la liaison entre l'anticorps et sa cible.

L'immunohistochimie permet ainsi d'analyser et de localiser, par visualisation directe, les composants cellulaires et tissulaires, et d'en déduire des fonctionnalités potentielles.

3-Les anticorps utilisés

On distingue deux types d'anticorps : les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux.

Les anticorps spécifiques peuvent être fabriqués en injectant à plusieurs reprises un échantillon de l'antigène (protéine à détecter) à un animal (le plus souvent, lapin ou chèvre), et en recueillant ensuite le sérum riche en anticorps (antisérum). Cet antisérum contient différents anticorps dits polyclonaux, produits par différents plasmocytes, reconnaissant divers antigènes de la protéine d'intérêt. Cette méthode est simple et peu coûteuse, mais elle présente des inconvénients qui sont : des risques de réactions croisées (signal non spécifique) et des quantités limitées de sérum.

Un anticorps monoclonal correspond à une population d'anticorps identiques dirigés contre le même site antigénique d'une protéine. Ces anticorps sont produits en grande quantité en culture par un clone de lymphocytes B selon la technique des hybridomes. Après avoir immunisé une souris contre un antigène donné, on prélève dans sa rate des lymphocytes B. Ceux-ci sont fusionnés avec des cellules myélomateuses tumorales immortalisées. Après

sélection, les hybridomes ainsi obtenus sont une source permanente et stable d'un seul type d'anticorps monoclonal. La spécificité des anticorps monoclonaux est supérieure à celle des sérums polyclonaux, mais leur sensibilité peut être inférieure. Cette méthode limite les réactions croisées, mais elle est longue, coûteuse et a des résultats incertains.

4- Apport de l'immunohistochimie dans le diagnostic des cancers

L'immunohistochimie est largement utilisée pour le diagnostic et/ou le suivi des cancers par détection de cellules anormales telles que celles trouvées dans les tumeurs cancéreuses. En effet, cette technique a eu un impact majeur sur le diagnostic des tumeurs du fait que :

- de nombreux types de tumeurs expriment des molécules plus ou moins spécifiques.
- les épitopes sont très souvent conservés dans le matériel tumoral inclus en paraffine.
- la sensibilité et la spécificité de la technique sont généralement bonnes.
- de nouveaux marqueurs peuvent être analysés.

Des marqueurs spécifiques sont ainsi aujourd'hui connus pour divers cancers. Parmi ces marqueurs:

- L'antigène carcino-embryonnaire (CEA): utilisé en cas de cancer du côlon;
- **CD15** et **CD30**: utilisés pour la maladie de Hodgkin;
- alpha-fœtoprotéine: utilisé en cas de carcinome hépatocellulaire;
- **CD117**: utilisé en cas de tumeur stromale gastro-intestinale;

Les anticorps utilisés dans le cas du cancer du sein sont :

- Ki-67** : marqueurs de prolifération
- Her2** : marqueurs cytoplasmique
- RO** : Récepteur oestrogénique
- RP** : Récepteur progestatif

Exemples : Cancer sein : RO/RP Récepteurs hormonaux

Les hormones œstradiol et progestérones sont impliquées dans la croissance des Cellules mammaires (stimulation de la multiplication cellulaire). Plus de 2/3 des tumeurs du sein ont des récepteurs à l'œstradiol (RO) Détectables sous la forme d'un marquage nucléaire en IHC. Les patientes avec un cancer RO+ sont sensibles aux médicaments antioestrogènes comme le tamoxifène, les patients peuvent suivre une hormonothérapie.

5-Application et limitation de la technique

Les applications de l'immunohistochimie sont innombrables. Parmi les plus importantes citons :

-le diagnostic différentiel des tumeurs indifférenciées (carcinome, sarcome, mélanome, ou lymphome malin).

- la catégorisation des leucémies et des lymphomes.

-l'identification de l'origine d'une métastase ainsi que la détection de molécules ayant une importance pronostique et/ou thérapeutique (récepteurs hormonaux d'un cancer mammaire par exemple).

Les limitations de la technique sont d'ordre purement pratique, d'où l'importance cruciale d'une formation adéquate des techniciens dans la manipulation et l'utilisation des anticorps d'une part, et d'une expérience minimale du pathologiste dans l'interprétation des images d'autre part. L'immunohistochimie ayant un prix, il est indispensable de faire le bon choix parmi les très nombreux anticorps disponibles, leur importance diagnostique étant fort variable.

En bref, l'immunohistochimie permet au pathologiste de préciser son diagnostic au maximum, ce qui à son tour, donne au clinicien la possibilité de choisir le traitement optimal pour son patient.

6-Avantages et inconvénients de la technique

Les principaux avantages de cette technique sont sa sensibilité, sa spécificité, et la facilité de sa mise en œuvre. De plus, elle permet, par une approche morphologique, de préciser la répartition des motifs d'intérêt dans un tissu et de localiser le signal dans les différents compartiments cellulaires.

L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique conventionnel ou à épi fluorescence pour les traceurs fluorescents. Elle peut être appliquée à des coupes de tissu fixé, à des cryocoupes, ou des préparations cellulaires de diverse nature.

La coloration obtenue est stable, permettant archivage et études rétrospectives. La qualité du signal obtenu est généralement meilleure à partir de tissu fixé. Cependant la plupart des fixateurs comportent un risque de modification, de masquage ou d'altération de l'épitope d'intérêt.

I-Matériel

Notre étude est une analyse rétrospective ayant porté sur 77 cas de prélèvement mammaires réalisée dans le service d'anatomie pathologique de Centre hospitalier Universitaire Hassan II de Fès, durant une période de 2 mois s'étalant du 07/04/2014 au 31/05/2014. Nous avons assisté et partiellement participé aux différentes étapes de l'étude histologique et histochimique depuis la réception des échantillons jusqu'à la lecture des lames et la caractérisation des tumeurs.

II- Méthode expérimentale

1-Examen histologique sur tissu fixé

Les prélèvements destinés au laboratoire pour un examen histologique, passent par une série d'étapes avant qu'ils ne soient lus et interprétés par le pathologiste responsable.

La technique est réalisée en cinq étapes qui sont principalement :

- La fixation.
- L'inclusion.
- La microtomie.
- La coloration.
- Le montage.

1.1- La fixation

Elle constitue une technique de référence pour l'étude histologique des prélèvements humains destinés à un examen anatomopathologique. C'est une étape essentielle dans la préparation tissulaire. Son but est de s'opposer à l'autolyse tissulaire et à la putréfaction, de garantir la conservation des structures et le durcissement des pièces, afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

Les échantillons sont fixés dans du formol à 10%. La durée de fixation est variable et la quantité de fixateur utilisée doit être au moins dix fois plus importante que le volume de tissu à fixer : quelques heures suffisent donc pour fixer les petits fragments.

Les fragments sont ensuite incubés dans des cassettes susceptibles de subir une inclusion dans la paraffine (Figure 1).



Figure 1 : Inclusion des fragments dans les cassettes

1.2-L'inclusion

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltré. Les tissus acquièrent ainsi une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome.

La substance d'inclusion, généralement la paraffine, est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

Comme cette substance est hydrophobe (non miscible à l'eau), la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant son inclusion dans la paraffine. Vu qu'elle est aussi non soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; une double substitution doit être réalisée. L'eau est remplacée par l'alcool (déshydratation) et l'alcool par le toluène (substitution).

Pour réaliser cette étape, un automate d'inclusion appelé histokinette est utilisé (Figure 3).

Cet automate peut se charger de toutes les phases conduisant à la mise à disposition d'un bloc de paraffine prêt à être coupé au microtome.

L'étape de circulation consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires.

- Fixation dans 2 bains de Formol 10% (30 min x 2).
- Déshydratation par l'alcool: consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient,
- tenant compte que l'agent déshydratant doit être miscible en même temps à l'eau et à la paraffine. La déshydratation se fait dans 5 bains d'Alcool de degré croissant 75%, 80%, 90%, 95%, et absolu (1h x 3, 1h30 et 2h).
- Eclaircissement par le toluène : cette étape est destinée à remplacer l'alcool par un solvant de la paraffine et à chasser l'alcool par trois bains successifs de toluène. En

remplaçant l'agent déshydratant, le toluène rend le tissu transparent d'où le nom d'éclaircissement. Cette opération se déroule dans 3 bains de Toluène (1h, 1h30 et 2h).

- Enrobage dans la paraffine : c'est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans la paraffine liquide. 2 bains de Paraffine (2h et 3h) sont utilisés.



Figure2 : Histokinette, Automate permettant l'inclusion des échantillons fixés dans de la paraffine après déshydratation.

L'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool). Cette étape se fait par un appareil d'enrobage représentée par la figure 3.



Figure 3 :appareil d'enrobage (ou d'inclusion) dans la paraffine.

Le bloc devient plus facile à manipuler que le tissu seul, et il peut s'attacher à la pince porte-objet du microtome sans briser la pièce.

1.3-Réalisation des coupes ou microtomie

Après montage du bloc dans le porte-bloc du microtome destiné à produire de fines tranches (3-5 μ m), la réalisation des rubans est effectuée à l'aide du microtome (Figure4).



Figure 4: Microtomie

Ces coupes sont immergées dans des bains d'alcool, puis étalées en les dépliant sur la lame par flottation à la surface d'un bain chaud [6].

1.4-Coloration

La coloration histologique permet de différencier finement tous les éléments d'un tissu. Elle consiste à accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

La coloration utilisée est de type H.E.S (hématoxyline-éosine safran). Elle a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène. L'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose, et le safran colore les fibres de collagène en jaune. Les lames doivent être préparées, afin de pouvoir recevoir les colorants. La coloration est précédée de déparaffinage et d'hydratation.

1.4.1-Déparaffinage

Cette étape consiste à enlever la paraffine de la coupe tissulaire pour que les colorants (préparés en phase aqueuse), puissent pénétrer le tissu et le colorer. Pour cela les lames sont mises dans l'étuve à 70°C pendant une heure, puis plongés dans le toluène.

1.4.2-Hydratation

Elle a pour objet de retirer le toluène du tissu et le remplacer par de l'eau. Le toluène et l'eau n'étant pas miscibles, le toluène est d'abord remplacé par l'alcool, puis les lames sont passées dans un bain d'eau courante, permettant de remplacer l'alcool par l'eau.

1.5- Le montage

Cette opération consiste, une fois la coloration terminée, à fixer à l'aide d'un milieu de montage, une lamelle de verre sur la coupe tissulaire.

Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.



Figure 5 : Lames montées et colorées

La lame colorée est ensuite transmise au médecin anatomopathologiste de la plateforme pour identifier une zone contenant plus de 50% de cellules tumorales. La zone d'intérêt est cerclée avec un marqueur et séparée du reste de l'échantillon par macro-dissection, afin de s'assurer d'une proportion de cellules tumorales supérieure à 50 % et de réduire ainsi la contamination par les cellules normales. S'il y a plus de 50% de cellules tumorales, le test est

considéré comme fiable. Dans le cas contraire, les cellules saines peuvent interférer et il y a un risque de conclure à un résultat faux négatif.

Les lames préparées sont ensuite étudiées par l'immunohistochimie.

2- Etude immunohistochimique.

2.1-Détection des récepteurs hormonaux , des cytokératines et du Ki-67.

Des coupes de tissus tumoraux sont étalées sur des lames prétraitées pour une adhésion maximale du tissu au support, puis incubées pendant 60 min à 58°C et pendant une nuit à 37°C .Le reste de la paraffine est éliminé par deux passages successifs dans des bains de toluène (5min chacun). Les lames sont ensuite plongées dans trois bains d'alcool à concentrations décroissantes (5 min chacun) et réhydratées par un rinçage à l'eau courante (10 min). L'inhibition des peroxydases endogènes est obtenue après incubation des coupes histologiques avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,4% pendant 15 min ; puis un démasquage antigénique est réalisé en portant à ébullition les coupes histologiques dans une solution de tampon citrate (pH=6) pendant 5 min. Après refroidissement, les coupes sont trempées dans une solution de PBS (phosphate buffered saline) pendant 5 min, puis elles sont incubées pendant 15 min avec la protéine bloquante, ensuite pendant 1h20 min avec l'anticorps primaire. Après rinçage au PBS, l'anticorps secondaire biotinylé est appliqué d'abord pendant 20 min puis le complexe de peroxydase-streptavidine est appliqué pendant 20 min avec des rinçages au PBS entre les deux applications (5 min chacun). Pour révéler la réaction immunohistochimique l'échantillon est recouvert pendant exactement 10min d'un réactif de coloration préparé extemporanément en mélangeant 2 gouttes de chromogène à 5 ml d' amino-éthyle-carbazole (AEC). Après rinçage a l'eau courante (10min), les lames sont incubées dans un bain d'hématoxyline pendant 1min 30s , rincées à l'eau puis passées rapidement dans du carbonate de lithium saturé avant rinçage à l'eau distillée. Enfin, montage des coupes entre lame et lamelle en utilisant un milieu aqueux spécifique à l'AEC.

2.2-Détection de l'oncoprotéine Her2

Les coupes histologiques sont déposées sur lames prétraités, incubées à 58°C pendant 1h puis à 37 °C pendant une nuit, puis elles sont déparaffinées et réhydratées.

Afin de restaurer l'antigénicité des épitopes Her2, les coupes sont immergées pendant 40 min dans une solution citrate (10 mmol/l) préalablement chauffée à 96°C.

Après refroidissement de la solution à température ambiante, les lames sont ensuite rincées avec de l'eau distillée et plongée pendant 5 min dans 2 bains de tampon du lavage dilué (Tris /HCL : fournie avec le Kit d'Hercep Test).

Les tissus sont ensuite recouverts de réactif de blocage de la peroxydase endogène pendant 5 min (peroxyde d'hydrogène à 3% fournie avec le Kit d'Hercep Test). Après rinçage avec le tampon du lavage (Tris/HCL) (5min), l'anticorps primaire (protéine antihumaine Her2 de lapin) est appliqué pendant 30min .Les lames sont ensuite rincées avec du tampon Tris/HCL (5min), puis l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est appliqué pendant 30min.

La révélation de la réaction immunohistochimique est réalisée en incubant les coupes pendant 10 min avec la solution substrat chromogénique de la peroxydase « DAB» (3,3-diaminobenzidine, Dako). Les lames sont ensuite rincées et trempées 6 fois dans un bain de carbonate de lithium saturé. Ensuite les coupes sont rincées à l'eau distillée (5 min et recouvertes par une lamelle après leur déshydratation.

3-Lecture des lames après immunohistochimie

Les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone sont considérés positifs lorsque plus de 10% des noyaux des cellules tumorales étaient marqués, quelle que soit l'intensité du marquage (Awada et al, 2005 ;Dowseft et al ; 2008 ;). Actuellement, le seuil fixé à 1% est introduit dans les recommandations nord-américaines (Hammond et al ; 2010).

Le score Her2 déterminé selon les recommandations de l'ASCO (tableau1) (Wolff et al ,2007), variant du score 0 au score 3+. Pour les tumeurs ayant un score 2+, considéré douteux, une étude complémentaire par FISH (hybridation in situ par fluorescence) est nécessaire.

Tableau 3: score Her2 selon les recommandations de l'ASCO.

Score	Marquage	Interprétations
0	Absence de marquage ou marquage membranaire intéressant moins de 10% des cellules infiltrantes	Négatif
1+	Faible marquage membranaire intéressant plus de 10% des cellules	Négatif
2+	Marquage membranaire complet, faible à modéré, intéressant >10% de cellules ou moins de <30% avec un marquage membranaire intense et complet	Cas douteux
3+	Marquage membranaire intense de >30% des cellules	Positif

L'expression de l'antigène Ki-67 est évaluée selon la proportion estimée du marquage nucléaire des cellules tumorales et les tumeurs ayant un Ki-67>14% sont des tumeurs prolifératives.

A- Résultats

I-Résultats de l'étude histologique.

1- répartition selon le type de prélèvement

Dans la série des patients sur lesquels ce travail a été effectué, la figure 6 montre que le patey (mastectomie totale avec curage ganglionnaire) représente le pourcentage le plus élevé (35,06%), et la relecture représente la dernière fraction (3,89%). La tumorectomie n'est pratiquée que dans 7,79%.

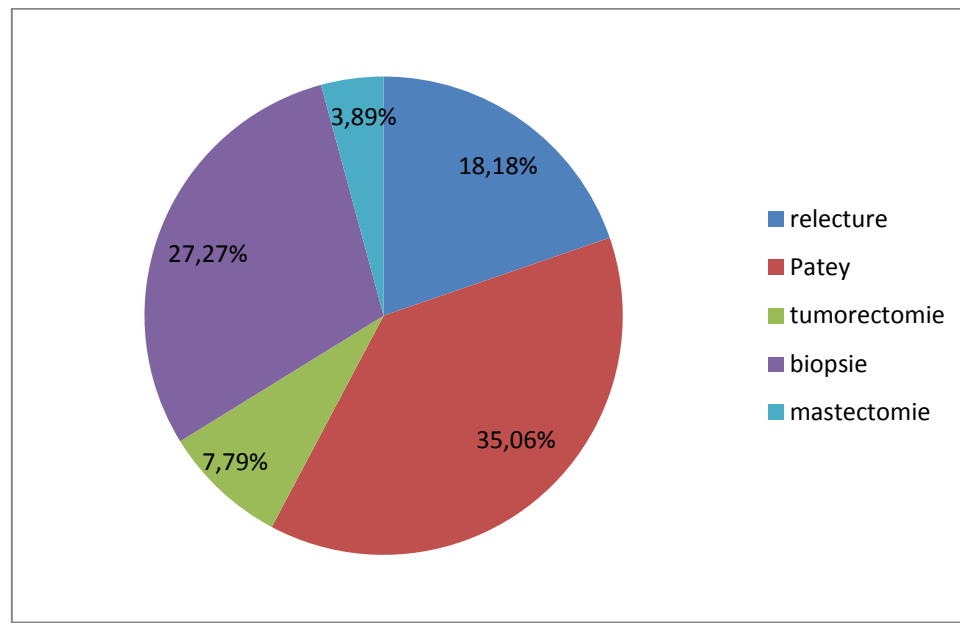


Figure 6 : répartition selon le type de prélèvement.

2- Répartition des cas de cancer en fonction de l'âge

L'âge moyen des malades présentant un cancer de sein est de 49,40 ans. Les extrêmes d'âge sont de 21 ans et 77 ans. La figure 7 illustre le nombre de cas de cancer en fonction de la tranche d'âge des patients. C'est entre 50 et 60 ans que cette pathologie est la plus dominante avec 42,85%.

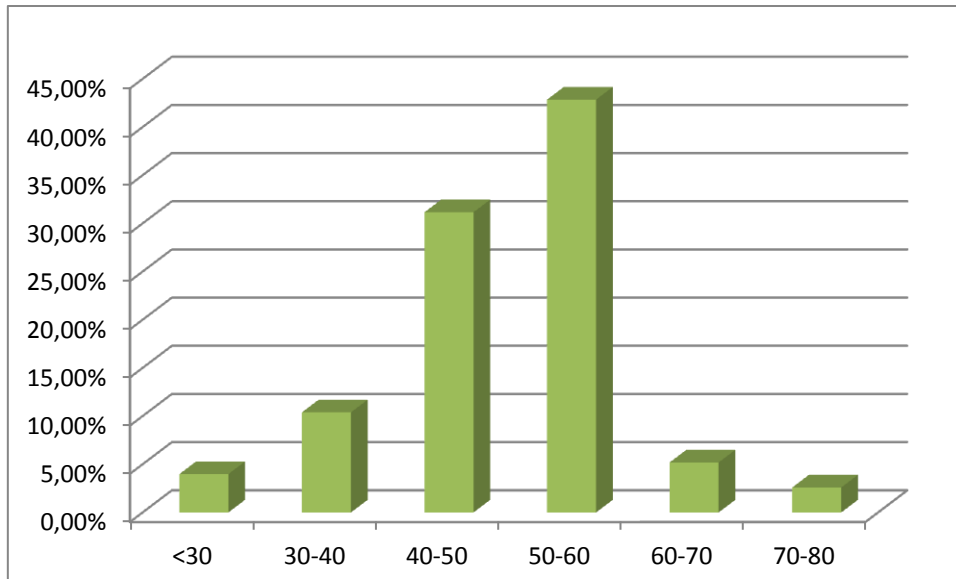


Figure 7 : Répartition des cas de cancers du sein en fonction de l'âge

3- Répartition des grades du cancer de sein

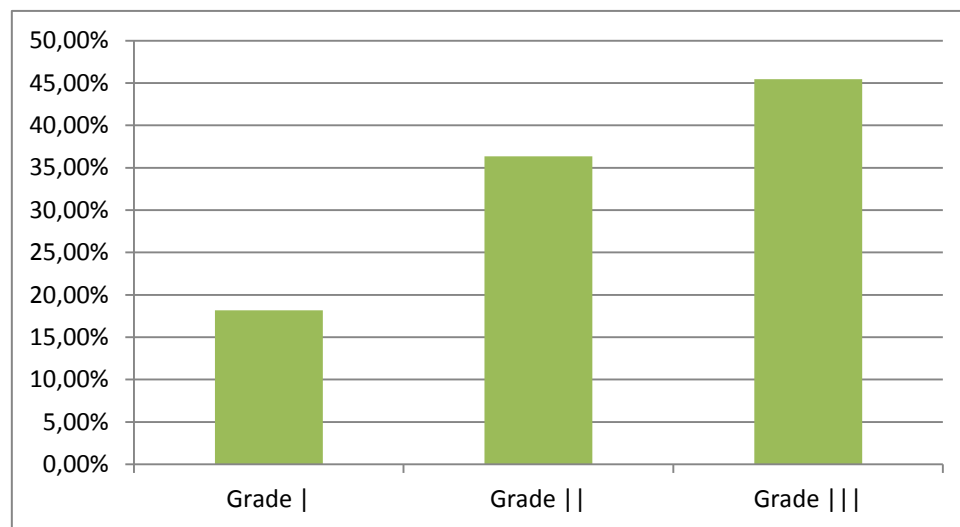


Figure 8: Répartition des grades histologiques des tumeurs mammaires

La figure 8 montre la répartition des grades histologiques des tumeurs mammaires sur 77 cas examinés au CHU pendant la période de mon stage. Le grade III représente le pourcentage le plus élevé (45,45%) suivi par le grade II qui représente 36,36% de l'ensemble des cas. En troisième position vient le grade I par une fraction de 18,19%.

II-Résultats immunohistochimique.

1-répartition selon le score de Her2

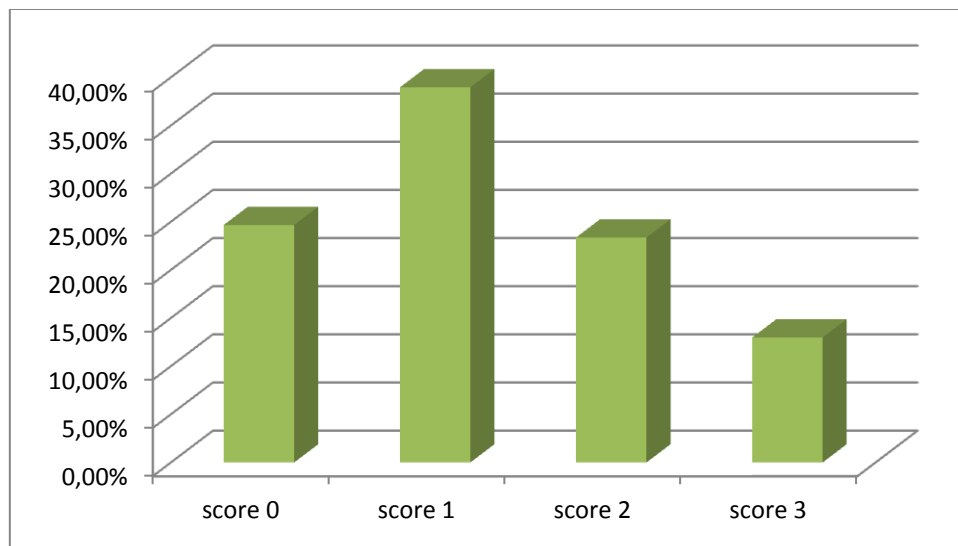


Figure 9: Répartition des scores de Her2 chez les patientes

Dans la série des patients sur lesquels ce travail a été effectué, le figure 9 montre que les cas négatifs représentés par le score 0 et le score 1 sont prédominants avec un pourcentage de 63,63% (38,96% pour le score 1 et 24,67% pour le score 0). Les cas positifs (score 3) représentent 12,98% de l'ensemble des cas. On note également les cas douteux représentés par le score 2 avec une fraction de 23,37%.

Les figures 11 et 12 montrent des exemples de résultat microscopique des cancers de sein Her2 négatif (Figure 10) et Her2 positif (Figure 11). L'apparence et la couleur des cellules tumorales peuvent fournir des indices quant à la façon de traiter une patiente. Par exemple, la figure 11 montre un échantillon positif en ce qui concerne la présence de la protéine Her2 au score 3, avec un marquage membranaire intense ; plus de 30% des cellules sont marquées. L'échantillon de la figure 10, quant à lui, représente la présence de Her2 au score 1. Avec un marquage membranaire intéressant moins de 10% des cellules infiltrantes.

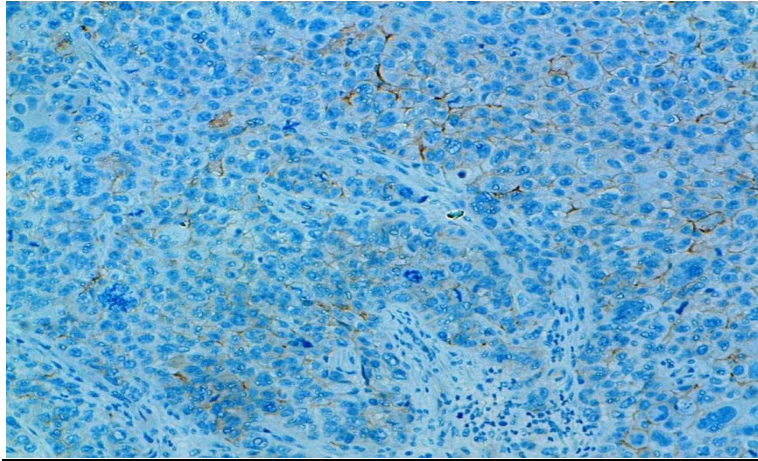


Figure 10: Cancer du sein HER2 score 1

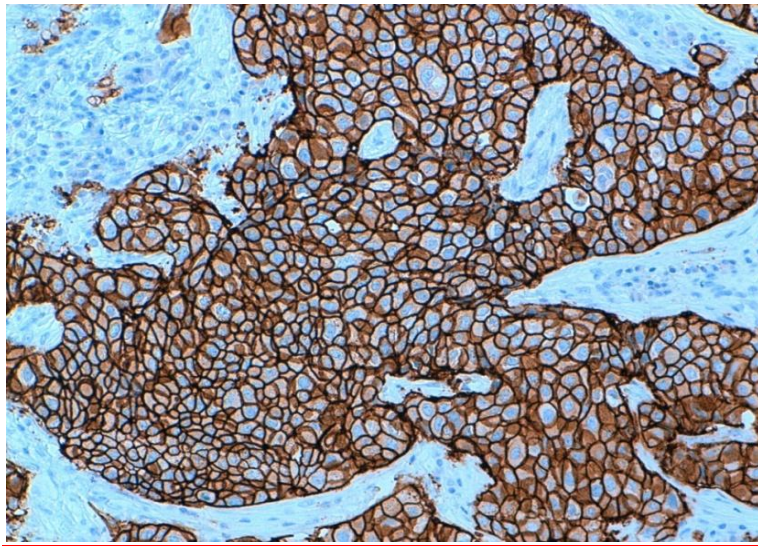


Figure 11 : Cancer du sein HER2 score 3 en immunohistochimie

2-Résultats de Ki-67

L'expression de l'antigène Ki-67 qui est un indice de prolifération a été recherché chez 20 patientes.

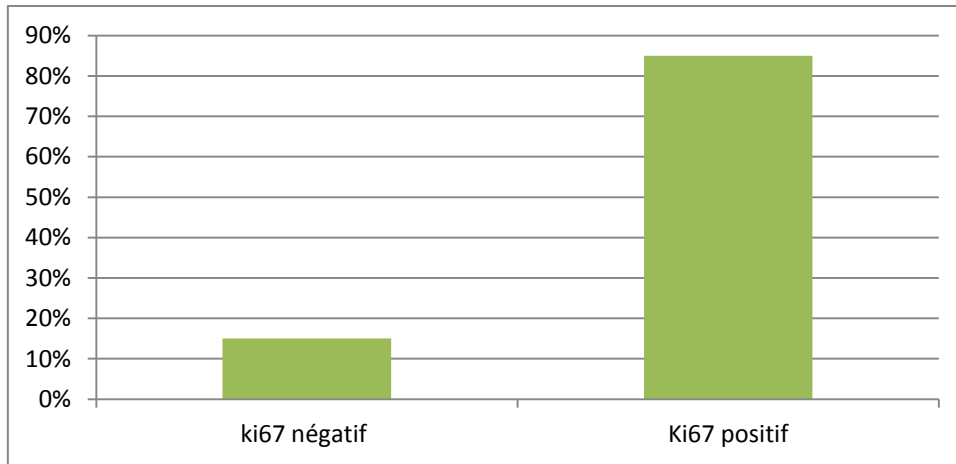


Figure 12 : Résultats de Ki 67.

La figure 12 montre que 15% des patientes ont un Ki-67 négatif et 85% des cas ont un Ki-67 positif. Rappelons que les tumeurs ayant un Ki-67>14% sont des tumeurs Ki-67 positives et prolifératives. Ce sont des tumeurs de mauvais pronostic.

3-Résultats des RO (récepteurs oestrogénique).

La figure 13 montre que 90,91% de la population ont un RO positif, alors que 9,09% de la population ont un RO négatif, on précise qu'un RO est positif lorsque plus de 10% des noyaux des cellules tumorales sont marqués. L'aspect de ces noyaux est illustré par la figure 14 qui montre un exemple de résultat microscopique d'un cas RO positif. Ces patientes ayant des récepteurs des oestrogènes pourront subir un traitement hormonal.

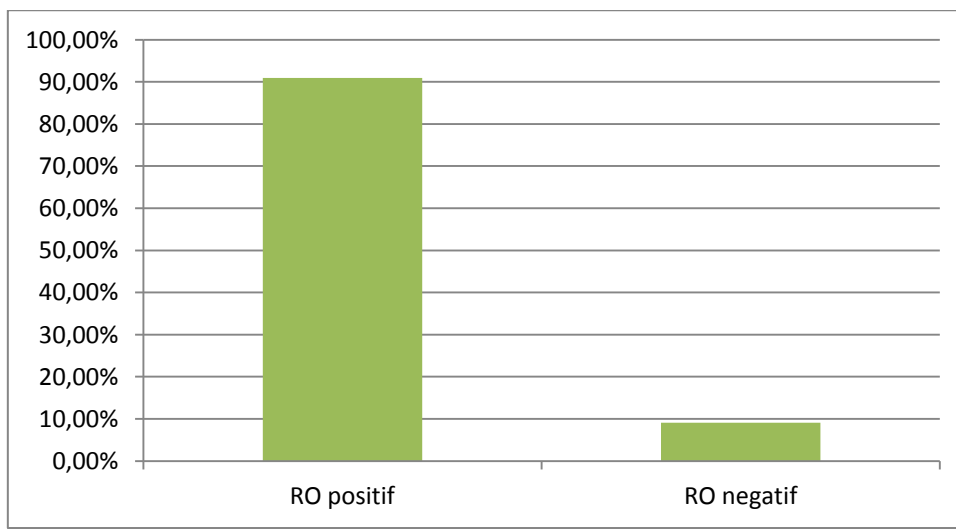


Figure 13 : Pourcentage des patientes présentant des récepteurs oestrogénique(RO)

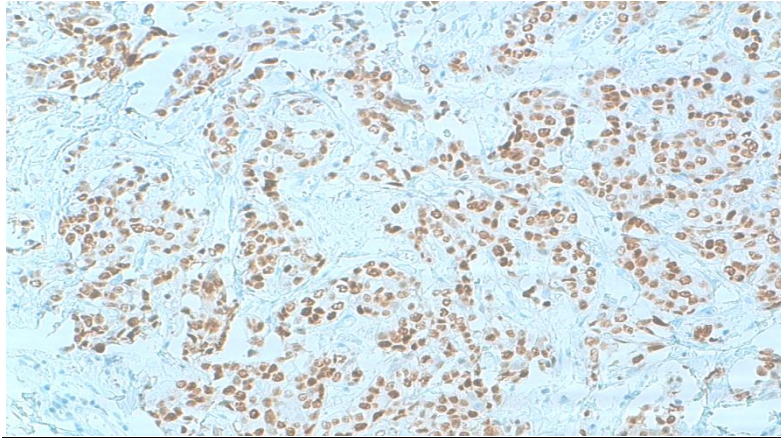


Figure 14 : Cancer du sein RO positif en immunohistochimie

B- Discussion

Depuis 2008, année de l'inauguration du CHU de Fès, le nombre de malades cancéreux adressés pour prise en charge, n'a cessé d'augmenter. En 2014, presque la moitié des malades hospitalisés présentaient un cancer. Notre étude, réalisée dans le cadre d'un stage de fin d'étude, a porté sur 77 cas de cancers recrutés au CHU au service anatomopathologie pendant la période du stage.

En ce qui concerne la répartition du cancer de sein en fonction de l'âge et en comparant les résultats obtenus avec ceux du registre de Rabat et du registre du grand Casablanca, les différentes populations étudiées présentent un âge relativement similaire. La plupart des tranches d'âge examinées présentent un âge relativement similaire prédominant chez les patients âgés entre 50 et 60 ans. Concernant les statistiques liées aux grades histologiques du cancer de sein, une prédominance du grade III a été remarquée, suivi par les grades II et I. on mentionne que le grade III est le plus grave et le plus avancé. Il est de mauvais pronostic et concerne des gens qui arrivent tardivement au CHU et dont le dépistage est tardif surtout à cause de l'ignorance et du manque de sensibilisation. Dans ce sens, nos résultats ont montré que la tumorectomie c'est-à-dire la chirurgie conservatrice procédant à l'exérèse de la tumeur uniquement n'est pratiquée que dans très peu des cas (7,79%). Dans la majorité des cas, c'est la mastectomie totale avec curage ganglionnaire (patey) qui est la plus employée (35,06%), ceci pose de réels problèmes à la fois esthétiques mais surtout psychologiques pouvant avoir des impacts très négatifs sur la réponse aux traitements et montrant encore une fois l'intérêt d'un dépistage précoce pouvant éviter cette pratique chirurgicale.

Pour l'oncoprotéine Her2, les patientes Her2 positives sont les moins nombreuses. Ce sont les Her2 négatives qui sont présentes avec un pourcentage élevé. Les protéines Her2 influent sur la façon dont les cellules poussent, se divisent et se réparent ; elles contribuent ainsi à un bon équilibre général. Cependant, leur présence en excès à la surface des cellules tumorales donne à la maladie un caractère agressif. On a en effet constaté dans le cas des Her2 positif une agressivité plus importante de la cellule tumorale, des rechutes plus rapides de la maladie, la survenue plus fréquente de métastases et une résistance de la tumeur aux thérapeutiques conventionnelles. Mais ces cancers bien particuliers peuvent bénéficier de traitement ciblé (Pegram et *al.*, 2004). D'où l'intérêt de rechercher le statut Her2 pour une meilleure prise en charge des patientes. Dans ce sens la technique immunohistochimique réalisée au CHU est d'une grande importance.

En ce qui concerne l'indice de prolifération mitotique ki-67. Nos résultats obtenus, sur 20 patientes, ont montré que 85% des tumeurs ont un Ki-67 positif et donc ce sont des tumeurs prolifératives. La molécule, Ki-67, est un bon indicateur du taux de prolifération cellulaire. Ce marqueur est déjà utilisé pour définir l'agressivité d'un cancer du sein à un stade avancé. Le taux de la molécule Ki-67 est corrélé avec la taille de la tumeur, l'envahissement des ganglions ainsi que le grade de la tumeur. Il est donc normal de trouver une abondance de Ki-67 positif du fait que le grade histologique le plus abondant chez les patientes est le grade III.

Pour les récepteurs oestrogéniques, 90,91% des cancers du sein sur lesquels nous avons réalisé le marquage immunohistochimique présentent des récepteurs d'oestrogène positifs. Ce sont donc des tumeurs hormonosensibles. L'oestrogène et la progestérone sont 2 hormones femelles. Elles peuvent favoriser la croissance de certaines cellules, dont celles du cancer du sein. C'est sur les récepteurs que les hormones se fixent aux cellules et qui peuvent affecter le comportement ou la croissance des cellules. Connaître le statut des récepteurs hormonaux de la tumeur aide les médecins à prévoir : la réaction du cancer du sein à l'hormonothérapie.

C'est ainsi qu'une tumeur RE positive est plus susceptible de réagir à l'hormonothérapie qu'une tumeur RE négative. Une tumeur qui est à la fois RE positive et RP positive (plutôt que seulement RE positive) pourrait réagir encore mieux à l'hormonothérapie. D'où l'intérêt de déterminer également les récepteurs RP. Une femme dont la tumeur est RP positive peut aussi être traitée par hormonothérapie. Mais, une tumeur dont les récepteurs hormonaux sont négatifs (RE- et RP-) ne réagit pas à l'hormonothérapie.

Conclusion

Au cours des travaux présentés dans ce rapport, deux aspects principaux ont été abordés. L'étude histologique suivie par l'étude immunohistochimique, afin de caractériser les cas de cancer de sein recrutés au CHU.

Les aspects histologiques obtenus permettent de bien différencier entre les différents grades de la tumeur. Le grade I et II se caractérisent par une prolifération cellulaire moins abondante par rapport au grade III qui présente une densité cellulaire assez importante avec présence de mitoses et de quelques foyers nécrosés.

Le grade III est le grade le plus malin, il est caractérisé par l'assemblage de plusieurs critères tels une densité cellulaire très importante, la présence de plusieurs nécroses en plus d'une prolifération. C'est ce grade III qui est prédominant chez la population étudiée ce qui montre un dépistage tardif de la maladie d'où l'intérêt de multiplier les campagnes de sensibilisation pour un dépistage précoce.

Le deuxième critère recherché dans notre projet concerne la recherche du statut Her2 du Ki-67 et des récepteurs oestrogènes en utilisant la technique immunohistochimique.

Pour l'oncoprotéine Her2, les patientes Her2 positives sont les moins nombreuses. Ce sont les Her2 négatives qui sont présentes avec un pourcentage élevé.

En ce qui concerne l'indice de prolifération mitotique Ki-67. Nos résultats obtenus, sur 20 patientes, ont montré que 85% des tumeurs ont un Ki-67 positif et donc ce sont des tumeurs prolifératives.

Pour les récepteurs oestrogéniques, 90,91% des cancers du sein sur lesquels nous avons réalisé le marquage immunohistochimique présentent des récepteurs d'oestrogène positifs. Ce sont donc des tumeurs hormonosensibles pouvant bénéficier d'un traitement hormonal.

Cette étude a montré que l'utilisation de l'immunohistochimie aux pratiques cliniques courantes est cruciale. Elle permet de spécifier chaque type de cancer de sein. Ceci permettra sans doute, une meilleure prise en charge des patientes par une thérapie ciblée évitant de subir les effets toxiques inutiles découlant d'un traitement inefficace.

Référence bibliographique

- Atlas of diagnostic immunohistopathology. Ed True LD. Lippincott, Co. New York, 1990.
- Pegram MD1., Konecny GE, O'Callaghan C, Beryt M, Pietras R, Slamon DJ (2004) Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 19;96(10):739-49
- <http://www.ajol.info/index.php/cmch/article/view/35824>

- <http://brg.prd.fr/Internet/Hebergement/AFH/revues/articles/histovol12/12-Article4.pdf>
- <http://www.cancer.ca/>
- <http://www.inserm.fr/thematiques/cancer/dossiers/cancer-du-sein>
- http://sante.canoe.ca/channel_condition_info_details.asp?disease_id=141&channel_id=2037&relation_id=32469
- <http://www.polyprepas.com/images/files/UE2%20chapitre%201%20M%C3%A9thodes%20en%20histologie.pdf>