



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Titre du Projet : Déroulement des différentes étapes
d'anapath. Technique coloration circulation et d'IHC, intérêt
examen anapath.**

Présenté par : Bouziane Nihal

Encadré par : Pr .Tazi Abdelali (FST Fès)

Dr .Ihsan Souaf(Centre El Yosr)

Soutenu le : jeudi 7 juin 2018

- **Devant le jury composé de :**
 - **Pr. Tazi Abdelali**
 - **Pr. Iraqui M**
 - **Dr. Ihsan Souaf**

**Stage effectué à : Centre El Yosr d'anatomie et de cytologie
pathologique.**

Année universitaire 2017-2018

DEDICACE :

A mes parents: En reconnaissance de tant de sacrifices consentis pour moi. En témoignage de tant de soins et d'amour déployés pour mon éducation, mon instruction et mon bien-être.

A mes chères sœurs: pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mes chers frères: pour leur appui et leur encouragement.

A toute ma famille: pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A mes professeurs: Je serais vaniteuse si je me devais énumérer en quelques lignes vos remarquables qualités humaines et professionnelles. Trouvez dans ce travail ma gratitude pour tout votre savoir-faire qui m'a guidé dans mon travail, vos soutiens et vos encouragements.

A mes amis et collègues : Pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Avec mes souhaits d'un avenir plein de joie et de succès. A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

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 **Mr Tazi Abdelali** pour son encadrement pédagogique et pour l'intérêt avec lequel il a suivi la progression de mon travail, pour ses conseils précieux, son soutien, ses encouragements et pour la réussite de ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont assistée dans la réalisation de ce mémoire.

Tout d'abord à mon encadrant au sein du laboratoire : **Docteur Ihssan Souaf** pour avoir acceptée de diriger mon travail avec rigueur et patience ainsi que pour toute l'attention, les conseils qu'elle a bien voulu me prodiguer lors de mon stage.

Je remercie également les techniciennes du laboratoire qui m'ont beaucoup soutenu à l'élaboration de ce rapport, j'ai aussi apprécié leur disponibilité et leur patience.

Merci à tous le corps professoral de la FST –Fès et à tous les agents du Centre El Yosr qui ont contribué directement ou indirectement à l'aboutissement de mon projet.

Mes remerciements les plus chaleureux sont aussi adressés au **Pr. Iraqui M** pour m'avoir honorée de sa présence et d'avoir accepté de juger mon travail. Je vous exprime tout mon respect et ma gratitude.

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

Merci

SOMMAIRE:

I.	Introduction générale :.....	- 8 -
II.	Intérêt de l'examen anatomopathologique :	- 9 -
III.	Méthode expérimentale:	- 10 -
A.	Qualité des prélèvements cellulaires/tissulaires et enregistrement:	- 10 -
B.	Examen histologique sur tissu fixé :	- 11 -
1.	Les prélèvements tissulaires :	- 11 -
2.	La fixation :	- 12 -
3.	Étude macroscopique :.....	- 13 -
4.	La circulation:	- 14 -
5.	L'inclusion :.....	- 15 -
6.	Microtomie ou réalisation des coupes :.....	- 16 -
7.	Déparaffinage :.....	- 17 -
8.	Hydratation :.....	- 17 -
9.	Coloration :.....	- 17 -
10.	Le montage :.....	- 19 -
IV.	Examen extemporané	- 19 -
V.	Examen cytologique:	- 20 -
VI.	L'immunohistochimie:.....	- 23 -
1.	Définition de la technique :	- 23 -
2.	Principe de la technique :	- 23 -
3.	Les anticorps utilisés :.....	- 27 -
4.	Application et limitation de la technique :	- 27 -
5.	Avantages et inconvénients de la technique :.....	- 28 -
VII.	Conclusion:	- 28 -

Liste des figures:

Figure 1:Inclusion des fragments dans les cassettes (Mesure et dissection d'une pièce d'œsogastrectomie fixée dans le formol puis sélection des prélèvements destinés à l'étude).Réf 1	- 13 -
Figure 2: Pièce d'exérèse de prostate et de vésicules séminales .Réf 2	- 14 -
Figure 3: Histokinette, Automate permettant l'inclusion des échantillons fixés dans de la paraffine après déshydratation.Réf 3.....	- 15 -
Figure 4:appareil d'enrobage (ou d'inclusion) dans la paraffine.Réf 4	- 16 -
Figure 5: Microtome.Réf 5	- 16 -
Figure 6: Lames montées et colorées.Réf 6	- 19 -

Liste d'abbreviation: -

CD117: Cluster of differentiation117	- 27 -
CD15: Cluster of differentiation 15	- 27 -
CD30: Cluster of differentiation 30	- 27 -
CK7: Cytokeratin 7	- 27 -
DAB: 3,3-	- 25 -
EA 50: L'Eosine-Azur.....	- 22 -
EDTA: Éthylènediaminetétraacétique.....	- 25 -
H.E: Hématoxyline-éosine	- 17 -
Her2: Human epidermal growth factor receptor 2	- 27 -
HRP: Histidine Rich Protein	- 24 -
IHC: Immunohistochimie.....	- 23 -
Ki-67: Antigène Ki-67	- 27 -
OG 6: L'Orange G.....	- 22 -
PBS: phosphate buffered saline	- 25 -
RO: Récepteur oestrogénique	- 27 -
RP:Récepteur progestatif	- 27 -
TTF-1: Thyroid transcription factor-1	- 27 -

Présentation de la structure d'accueil :

Avant d'aborder le thème de mon mémoire, il convient tout d'abord de présenter le Centre El Yosr d'anatomie et de cytologie pathologique, lieu de mon stage de fin d'étude.

Le Centre El Yosr d'anatomie et de cytologie pathologique a été inauguré par Dr.Ihsan Souaf en 2015 à Fès. Il se compose d'une salle de réception, de prélèvements, de macroscopie, d'une salle technique (histologie et cytologie), salle d'immunohistochimie, et la salle de lecture .

Le service d'anatomie pathologie où j'ai effectué mon stage est un service clé du laboratoire. Il traite la très grande majorité des examens cytologiques (liquides) et histologiques (biopsies et pièces opératoires) demandés par les différents médecins et chirurgiens spécialistes .

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 3 techniciennes.

I. Introduction générale :

L'anatomie pathologique (ou anatomopathologie) est une discipline médicale qui étudie les lésions provoquées par les maladies, ou associées à celles-ci, sur les organes, tissus ou cellules, en utilisant des techniques principalement fondées sur la morphologie macroscopique et microscopique. Les lésions sont des altérations morphologiques des organes, décelables par tout moyen d'observation. Celles-ci sont des signes de maladies, au même titre que les symptômes cliniques. Elles peuvent être le résultat de l'agression qui a déclenché la maladie, ou celui des réactions apparues au cours du déroulement du processus morbide. La lésion élémentaire correspond à l'altération morphologique d'une structure analysée isolément. L'association de différentes lésions élémentaires constitue un ensemble lésionnel. Il n'y a pas forcément de corrélation étroite entre l'importance d'une lésion et son expression clinique ou biologique. Les causes des lésions sont variées : anomalies génétiques constitutionnelles ou acquises, agents infectieux (bactéries, virus, parasites, champignons, prions), agents chimiques (toxiques, caustiques, médicaments), agents physiques (agression thermique, radiations, modifications de pression atmosphérique, traumatismes), déséquilibres circulatoires, nutritionnels ou hormonaux, troubles immunitaires innés ou acquis et sénescence. La démarche de l'anatomie pathologique est fondée sur une analyse sémiologique qui compare les tissus normaux et les tissus pathologiques. Les lésions sont confrontées aux données cliniques, biologiques et d'imagerie : c'est la corrélation anatomoclinique qui est indispensable pour permettre une interprétation synthétique qui aboutit à un diagnostic (certain, probable ou incertain).

L'objectif de mon stage a été l'observation permanente et le suivi des diverses techniques effectuées au sein du laboratoire El Yosr pour avoir une idée sur les procédures de ces techniques depuis le prélèvement jusqu'au résultat final.

II. Intérêt de l'examen anatomopathologique :

L'examen anatomopathologique consiste à analyser au microscope des cellules ou des tissus prélevés sur un organe , on parle aussi d'examen histopathologique. Cet examen anatomopathologique est souvent abrégé par les professionnels de santé en«examen anapath». C'est l'examen anatomopathologique qui permet d'établir de façon définitive le diagnostic de cancer. On parle de preuve histologique.

De manière générale, un examen anatomopathologique est réalisé à deux moments clés de la prise en charge d'un cancer :

- Au moment du diagnostic, lorsque l'on réalise un examen anatomopathologique de la biopsie .
- Après la chirurgie, lorsqu'un examen anatomopathologique de la pièce opératoire est demandé.

-Buts de l'anatomie pathologique dans la pratique médicale:

Le rôle de l'anatomocytologie est de contribuer à :

- élaborer le diagnostic par la démarche anatomoclinique : les lésions sont analysées et décrites dans un compte-rendu, puis l'anatomopathologiste doit intégrer l'ensemble des faits morphologiques et des renseignements cliniques pour, en conclusion du compte-rendu, affirmer un diagnostic ou proposer une hypothèse diagnostique ;
- préciser le pronostic en apportant des éléments utiles, en particulier dans le domaine de la pathologie tumorale ;
- évaluer l'effet des thérapeutiques : les examens anatomocytologiques sont renouvelés au cours d'un traitement afin de juger de la disparition, de la persistance ou de l'aggravation des lésions.

III. Méthode expérimentale:

A. Qualité des prélèvements cellulaires/tissulaires et enregistrement:

La qualité des prélèvements conditionne la qualité de l'étude anatomopathologique. Le médecin préleveur et prescripteur a une responsabilité dans l'acte anatomopathologique en s'assurant de la bonne réalisation technique du prélèvement et de son acheminement dans de bonnes conditions au laboratoire (dans des délais brefs, en respectant les règles de fixation, accompagné d'une demande d'examen correctement renseignée).

Enregistrement:

Lorsqu'un prélèvement parvient au laboratoire, il est enregistré et reçoit un numéro d'identification unique. Celui-ci sera retranscrit sur les blocs et les lames, qui seront examinées au microscope après le traitement technique du prélèvement. Chaque prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignements remplie par le médecin prescripteur qui doit mentionner :

1. l'identité du patient : nom, prénom(s), date de naissance, sexe .
2. le siège, la date (jour et heure) et la nature du prélèvement (biopsie ou exérèse) .
3. les circonstances cliniques et paracliniques qui ont motivé le prélèvement et éventuellement les hypothèses diagnostiques .
4. l'aspect macroscopique ou endoscopique des lésions (un compte-rendu opératoire peut être utilement joint), éventuellement l'aspect d'imagerie, en particulier pour les tumeurs osseuses .
5. les antécédents pathologiques du patient, en particulier, dans la mesure du possible, les antécédents d'examens anatomopathologiques effectués dans un autre laboratoire et la nature des traitements éventuellement administrés au malade .
6. le nom et coordonnées du médecin prescripteur et du préleveur, et éventuellement ceux des autres médecins correspondants.

B. 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. Les prélèvements tissulaires :

Les prélèvements tissulaires sont obtenus soit par biopsie, soit par dissection d'une pièce opératoire ou d'organes.

- Les biopsies :

- La biopsie est le prélèvement d'un fragment de tissu durant la vie par diverses méthodes (pincés, trocart, bistouri etc) .

- La valeur des biopsies à visée diagnostique repose sur:
 - La taille du prélèvement
 - Le nombre des fragments biopsiés .
 - La bonne qualité du matériel biopsié, due à l'habileté du préleveur et à la bonne qualité du matériel biopsique: les fragments tissulaires ne doivent pas être écrasés ou étirés .
 - La validité des zones biopsiées: les foyers de nécrose ou d'hémorragie ne devraient pas être prélevés .
 - Lorsque le prélèvement n'est pas valable pour une étude histopathologique, la biopsie doit être renouvelée .
 - L'orientation des prélèvements est souvent nécessaire en cancérologie, pour permettre une étude histopathologique rigoureuse:
 - Les biopsies exérèses, par exemple cutanées, seront orientées, soit par des fils de suture de couleurs différentes, soit par un tatouage à l'encre de chine
 - Les biopsies multiples intéressant plusieurs territoires d'un même organe

seront individualisées dans des flacons différents numérotés et répertoriés. Par exemple, pour les biopsies bronchiques: flacon n°1 - éperon lobaire supérieur gauche, 2 fragments; flacon n°2 - bronche lobaire supérieure gauche, 2 fragments.

- Les prélèvements biopsiques sont étudiés en totalité .

- Les pièces opératoires:

- Lors de la dissection d'une pièce opératoire, le pathologiste choisit les territoires lui semblant représentatifs des lésions.
- Les pièces opératoires sont disséquées selon des protocoles précis. Le pathologiste décrit et mesure la tumeur, son extension locale, dénombre les ganglions, recherche les lésions associées, étudie les limites de l'exérèse, ces limites ayant au préalable été repérées par le chirurgien (fils de suture de couleurs différentes, tatouage à l'encre de chine). Cet examen macroscopique oriente le choix et le nombre des zones qui seront prélevées pour l'étude histopathologique.
- Une photographie macroscopique de la pièce opératoire peut être réalisée dans la majorité des laboratoires.

2. 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 (Mesure et dissection d'une pièce d'œsogastrectomie fixée dans le formol puis sélection des prélèvements destinés à l'étude). Réf 1

3. Étude macroscopique :

L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire : la pièce est examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée .

Chaque lésion est repérée sur un schéma et éventuellement photographiée.

Ces constatations sont confrontées aux documents cliniques et/ou radiologiques, ce qui souligne l'importance des renseignements écrits fournis par le médecin clinicien. En cas de pièces opératoires complexes (exérèse monobloc de plusieurs organes, ou pièce de résection selon une méthode non conventionnelle), le chirurgien devra adresser la pièce avec des indications de repérage topographique. Il peut être utile de marquer les berges d'une pièce de résection de tumeur avec une encre indélébile : ceci ne nuit pas à l'étude histologique et permet d'apprécier exactement la distance entre la tumeur et la limite chirurgicale de la pièce (Figure 2) .

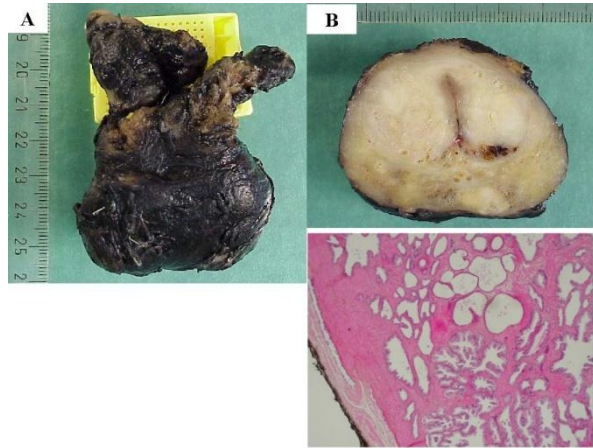


Figure 2: Pièce d'exérèse de prostate et de vésicules séminales .Réf 2

(A. Surface tatouée à l'encre de chine. B. Tranche de section de la prostate : l'encre ne pénètre pas en profondeur. En bas lors de l'examen microscopique, l'encre permet de repérer exactement les limites de la résection chirurgicale (limite noire à gauche)).

L'examen macroscopique donne des indications pour le pronostic de la maladie (notamment la taille et la localisation d'un cancer) et il permet de sélectionner les territoires à prélever pour l'étude microscopique : zones lésées, zones d'aspect macroscopique sain et limites d'exérèse.

Après le choix des prélèvements destinés à l'analyse microscopique, les restes de la pièce opératoire sont conservés pendant quelques jours ou semaines afin de pouvoir en cas de nécessité effectuer des prélèvements complémentaires.

4. La circulation:

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 ,en 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.

5. L'inclusion :

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltrer. 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).



Figure 3: Histokinette, Automate permettant l'inclusion des échantillons fixés dans de la paraffine après déshydratation. Réf 3

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 4).



Figure 4:appareil d'enrobage (ou d'inclusion) dans la paraffine.Réf 4

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.

6. Microtomie ou réalisation des coupes :

Après montage du bloc dans le porte-bloc du microtome destiné à produire de fines coupes (3-5 μ m), la réalisation des rubans est effectuée à l'aide du microtome (Figure5).



Figure 5: Microtome.Réf 5

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 .

7. 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 plongées dans le toluène.

8. 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.

9. 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 (hématoxyline-éosine). Elle a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules. L'hématoxyline(colorant basique nucléaire) colore le noyau en violet, l'éosine ou phloxine (colorant acide cytoplasmique) colore le cytoplasme en rose. Les lames doivent être préparées, afin de pouvoir recevoir les colorants.

La coloration est précédée de déparaffinage et d'hydratation selon le protocole suivant:

Réactifs	Durée
TOLUENE	5min
TOLUENE	5 min
TOLUENE	5 min
ALCOOL 96%	2 min
ALCOOL 80%	2 min
ALCOOL 70%	1 min
EAU	1 min
HEMATOXYLINE	passage
EAU	5 min
EOSINE	passage
EAU	2 min
ALCOOL 96%	2 min
ALCOOL 100%	3 min
ALCOOL 100%	3 min
TOLUENE	5 min
TOLUENE	5 min
TOLUENE	5 min

10. 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.

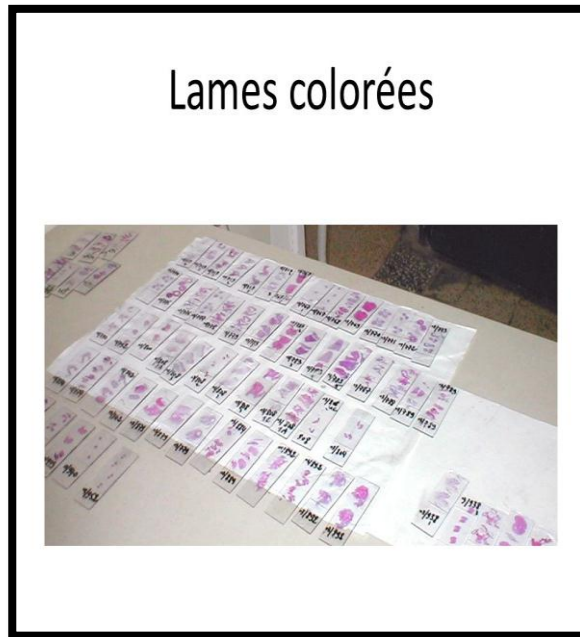


Figure 6: Lames montées et colorées. Réf 6

IV. Examen extemporané

Diagnostic anapath rapide en cours d'opération pour modifier un geste opératoire. Elle permet d'identifier :

- La nature bénigne ou maligne d'une lésion, modifiant le geste opératoire.
- Le caractère complet de la résection d'un cancer (marges saines bien délimités).
- S'assurer qu'une biopsie chirurgicale a bien intéressé un territoire lésionnel.

L'examen extemporané suit les étapes suivantes:

- prélèvement à l'état frais au cours d'une intervention chirurgicale
- coupe à congélation
- résultat dans les minutes suivant le prélèvement
- indiquée dans les cas où le résultat peut modifier le geste opératoire
- doit toujours être considéré comme un examen partiel et temporaire, en attente du résultat de l'examen définitif après fixation.

V. Examen cytologique:

Plusieurs prélèvements peuvent être étudiés dans l'examen cytologique:

- **liquides** recueillis par ponction d'épanchement dans une cavité (pleurale = pleurésie, péritonéale = liquide d'ascite) ; liquide céphalo-rachidien (ponction lombaire) ; liquide urinaire ; dans ces cas la partie technique est réalisée au laboratoire du service d'anatomie pathologique (cyto-centrifugation) ;
- les **produits de raclage** comme les frottis cervico-vaginaux et les produits de cytoponction d'organes sont étalés et fixés par le médecin qui réalise le prélèvement, qui est donc directement responsable de sa qualité technique.

Le cytodiagnostics présente des avantages indéniables :

- rapidité
- faible invasivité
- peu douloureux
- faible coût

Mais il permet uniquement de détecter la présence de cellules anormales . Le cytodiagnostics dépend fortement de l'anatomopathologiste (plus ou moins expérimenté).

Le cytodiagnostics est particulièrement indiqué dans le **dépistage** de lésions muqueuses peu visibles macroscopiquement, donc les lésions débutantes, car il permet d'examiner plus ou moins systématiquement une grande surface. L'exemple le plus connu est celui des frottis de dépistage des **lésions néoplasiques du col utérin** suivant cette technique:

-Homogénéiser bien le prélèvement.

-Eliminer la brosse.

-Remplir les puits avec le liquide selon la densité des cellules (400 µl du prélèvement + 400 µl de stikeur(liquide de préservation)).

-Centrifugation à (3 tr/min) pendant 10 min .

-Laisser les lames pour sécher.

-Coloration par le Papanicolaou.

-Séchage et montage.

les frottis sont réalisés au niveau vaginal, exo - et endo - cervical

- les étalements pas trop épais sont fixés immédiatement par une laque ou un mélange alcool-éther sur des lames propres
- coloration par le Papanicolaou selon le protocole suivant :

Réactifs	Durée
ALCOOL 80%	30 sec
ALCOOL 70%	30 sec
EAU	30 sec
HEMATOXYLINE	2 min
EAU	30 sec
ALCOOL 70%	30 sec
ALCOOL 80%	30 sec
ALCOOL 100%	30 sec
OG6	3 min
ALCOOL 100%	2 min
EA50	3 min
ALCOOL 100%	3 min
ALCOOL 100%	5 min
TOLUENE	3 min

Principe:

La coloration Papanicolaou est une coloration polychrome qui permet de différencier les cellules en fonction de leur maturité et de leur activité métabolique.

Elle est composée de trois colorants :

- L'hématoxyline de Harris qui colore les noyaux des cellules grâce à son affinité avec l'ADN
- **OG 6**: un colorant acide qui réagit avec les cellules squameuses matures de par son affinité avec la kératine
- **EA 50**: un colorant acide polychrome (éosine, vert lumière et brun de Bizmark) qui réagit avec le cytoplasme des cellules squameuses non matures (cellules basales et intermédiaires) ainsi qu'avec les cellules glandulaires et les hématies.

La transparence des cytoplasmes est très importante pour observer les agrégats de cellules. Elle dépend de la concentration d'éthanol dans la coloration. Ainsi, on observe :

- Les noyaux des cellules qui apparaissent en bleu/noir.
- Les cytoplasmes des cellules non kératinisées en bleu/vert transparent (cellules des couches profondes cyanophiles).
- Les cytoplasmes des cellules kératinisées en rose/orange transparent (cellules éosinophiles superficielles).
- Les hématies en rouge.

La coloration Papanicolaou est une coloration cytologique qui ne peut être utilisée que sur des échantillons liquides.

Pratiqués avec une périodicité adéquate, les frottis cervico-vaginaux (FCV) sont une méthode efficace et peu coûteuse .

VI. 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(IHC) permet ainsi d'analyser et de localiser, par visualisation directe, les composants cellulaires et tissulaires, et d'en déduire des fonctionnalités potentielles avec le protocole suivant:

Protocole IHC	Durée	
-Déparaffinage:étuve40°C pendant toute la nuit. -Après 1H dans l'étuve à 70 °C.	1H	
-Déparaffinage:	35 min	
1)TOLUENE		5 min
2)TOLUENE		5 min
3)TOLUENE		5 min
4)ALCOOL 100%		5 min
5)ALCOOL 100%		5 min
6)ALCOOL 70%		5 min
7) ALCOOL 70%		5 min
Wash buffer	5 min	
Démasquage 45 min à 95°C+ Refroidissement pendant 20 min à température ambiante	65 min	
Wash buffer	5 min	
Ultravision hydrogen peroxide block	10 min	
Wash buffer	5 min	
Ultravision protein block	5-10 min	
Tapoter les lames		
<u>Anticorps</u>	40 min	
Wash buffer	5 min	
Primary antibody amplifler quanto	10 min	
Wash buffer	5 min	
HRP polymer quanto	10 min	
Wash buffer(bien laver les lames avant	5 min	

DAB),new wash buffer	
DAB(30 µl DAB Quanto chromogen+ 1 ml DAB Quanto substrate)	5 min
Wash buffer	5 min
Hématoxyline	2 min
Wash buffer+ eau courant	
Déshydratation	

Les coupes histologiques sont déposées sur lames prétraités, incubées à 70°C pendant (1h) puis à 40 °C pendant une nuit, puis elles sont déparaffinées et réhydratées.

Les coupes sont immergées pendant (40 min)dans une solution citrate (pH=6) ou EDTA (pH=9) préalablement chauffée à 95°C.

Après refroidissement de la solution pendant 45 min à température ambiante, les lames sont ensuite rincées avec du wash buffer (PBS=phosphate buffered saline) pendant(5 min).

Les tissus sont ensuite recouverts de réactif de blocage de la peroxydase hydrogen pendant (10min) . Après rinçage avec le PBS (5min), le réactif de blocage proteine recouverts les tissus (10 min) , pendant(40 min) **l'anticorps** est appliqué, puis rinçage avec le PBS (5 min) ,l'anticorps primaire est appliqué pendant (10min) .Les lames sont ensuite rincées avec du PBS (5 min) , puis l'anticorps secondaire est appliqué pendant (10min) et rinçage avec un new wash buffer avant le " DAB".

La révélation de la réaction immunohistochimique est réalisée en incubant les coupes pendant (5 min)avec la solution substrat chromogénique de la peroxydase « DAB» (3,3-diaminobenzidine, Dako). Les lames sont ensuite rincées et trempées dans un bain d'hématoxyline pendant (2 min). Ensuite les coupes sont rincées à l'eau courante et recouvertes par une lamelle après leur déshydratation.

Après étalement, déparaffinage et séchage des coupes, l'**anticorps primaire** est déposé directement sur le tissu et reconnaît, s'il existe, le récepteur antigénique recherché. Un **deuxième anticorps** susceptible de se fixer à l'anticorps primaire et complexé à un système **avidine-biotine-peroxydase** permettant la révélation est appliqué.

La Diaminobenzidine ou l'Acide Ethynyl-Corbazole révèle la réaction en brun et rouge respectivement.

Une contre-coloration douce avec l'hématoxyline recolor le tissu et rend possible une détermination topographique du marquage.

Des automates existent pour effectuer les étapes qui suivent la préparation des coupes.

Néanmoins, les résultats connaissent des **variations importantes** d'un service à l'autre, d'un tissu à l'autre, d'un cas à l'autre. Ils dépendent de plusieurs étapes d'amont à commencer par la fixation, en particulier sa durée et le type de fixateur.

D'autres facteurs sont capitaux, notamment la dilution de l'anticorps et le mode de démasquage antigénique (par la chaleur).

Il est indispensable de s'assurer, par des **témoins positifs et négatifs** de la fiabilité des réactions. La coloration est stable et peut être analysée à tout moment, même plusieurs années après (études rétrospectives possibles). De même, le bloc en paraffine archivé peut être recoupé et donne la possibilité de réactions complémentaires ultérieures.

L'analyse impose une critique technique, une interprétation quant au seuil de positivité ou de négativité, la localisation cellulaire du marquage et enfin une confrontation précise avec les autres examens biologiques ou pathologiques

3. Les anticorps utilisés :

On distingue deux types d'anticorps : les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux. En effet, l'immunohistochimie 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:

- **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.
- **CK7** : un marqueur de cirrhose biliaire primitive.
- **TTF-1** : marqueur thyroïdiens et pulmonaires.

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.

Cette méthode limite les réactions croisées, mais elle est longue, couteuse et a des résultats qui connaissent des variations importantes.

4. 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.

5. Avantages et inconvénients de la technique :

Les avantages principaux 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.

VII. Conclusion:

En conclusion l'anatomie et cytologie pathologique est une spécialité médicale qui consiste à étudier, à l'œil nu puis au microscope, les tissus et les cellules .

Il s'agit d'une discipline médicale hautement spécialisée permettant :

- D'affirmer avec certitude le diagnostic de nombreuses maladies : ceci est particulièrement utile dans le domaine du cancer, mais également dans de nombreuses maladies inflammatoires.
- De dépister le cancer à un stade précoce ou avant-même sa survenue (lésions précancéreuses).

Références bibliographiques:

- 1:** [www.campus.cerimes.fr:\(/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_1/site/html/2_2.html\).](http://www.campus.cerimes.fr/(/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_1/site/html/2_2.html))
- 2 :** www.campus.cerimes.fr
- 3:** [www.imebinc.com\(/histology/refurbished-equipment/tissue-processors/leica-tp1020-tissue-processor.html\)](http://www.imebinc.com(/histology/refurbished-equipment/tissue-processors/leica-tp1020-tissue-processor.html))
- 4:** [www.microscopies.com:\(/DOSSIERS/PRATIQUES/TPM-3/COUPARAF%20.htm\)](http://www.microscopies.com:(/DOSSIERS/PRATIQUES/TPM-3/COUPARAF%20.htm))
- 5:** [www.leicabiosystems.com:\(/histology-equipment/sliding-and-vibrating-blade-microtomes/vibrating-blade-microtome/products/leica-vt1000-s/application/\)](http://www.leicabiosystems.com:(/histology-equipment/sliding-and-vibrating-blade-microtomes/vibrating-blade-microtome/products/leica-vt1000-s/application/))
- 6:** www.slideplayer.fr
- 7 :** [www.anapathbhd.free.fr:\(/cours/inflammatoire/buts_et_methodes_en_anatomie_pathologique.html\).](http://www.anapathbhd.free.fr:(/cours/inflammatoire/buts_et_methodes_en_anatomie_pathologique.html))
- 8 :** [www.docplayer.fr:\(/20227596-Immunohistochimie-en-pathologie-cancereuse.html\).](http://www.docplayer.fr:(/20227596-Immunohistochimie-en-pathologie-cancereuse.html))
- 9 :** [www.histalim.com:\(/accueil/activites/nos-services/histologie/papanicolaou/?lang=fr\).](http://www.histalim.com:(/accueil/activites/nos-services/histologie/papanicolaou/?lang=fr))
- 10 :** [www.oncoprof.net:\(/Generale2000/g04_Diagnostic/Histologie/Technique-texte/dg_ap_tech06.html\)](http://www.oncoprof.net:(/Generale2000/g04_Diagnostic/Histologie/Technique-texte/dg_ap_tech06.html))
- 11 :** [www.e-cancer.fr:\(/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Diagnostic/Examen-anatomopathologique\).](http://www.e-cancer.fr:(/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Diagnostic/Examen-anatomopathologique))