



Licence en Sciences & Techniques

Biologie & Santé

PROJET DE FIN D'ETUDES

APPLICATION DE L'IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE EN DERMATOPATHOLOGIE

Présenté par :

Maryem ARAQAS

Encadré par :

Pr. HARMOUCH Taoufiq

Pr. SEFRIQUI Samira

Dr INANI Kawtar

Dr AMEURTESSE Hassania

Soutenu le 13 Juin 2013 devant le jury composé de :

Pr. SEFRIQUI Samira

Pr. HARMOUCH Taoufiq

Dr INANI Kawtar

Dr AMEURTESSE Hassania

Pr. AARAB Lotfi

Président

Encadrant

Encadrant

Encadrant

Examineur

Année universitaire : 2012-2013

Remerciements

Au terme de ce projet, je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude au directeur du laboratoire central d'analyse qui m'a accueilli dans sa structure.

Je tiens à remercier énormément mon encadrant : Pr Toufik HARMOUCH, Professeur agrégé d'Histologie embryologie cyto génétique au sein du CHU-Fès, de m'avoir encadré avec bienveillance et de m'avoir prodigué ses conseils fructueux, durant toute la durée de ce travail.

Je n'oublierais pas non plus d'adresser mes profonds remerciements et ma sympathie à Dr Kawtar INANI qui a su me guider et qui a su m'apporter toute la compréhension et la réflexion scientifique qui pouvait me manquer.

Je remercie sincèrement Pr Samira SEFRIOU, pour m'avoir encadré tout au long de mon stage et m'avoir apporté ses précieux conseils ainsi que sa disponibilité.

Mes remerciements s'adressent également à Pr. AARAB Loufi ainsi tous les membres de jury de vouloir accepter de jurer de modeste travail.

Enfin, je terminerais en remerciant ma famille et surtout ma chère mère. Merci d'avoir suivi tout ce travail, et d'y être intéressé. Merci pour votre aide quotidienne, votre soutien sans faille, dans les moments faciles, comme dans les difficiles, dans les moments de doutes et de remises en question, merci d'avoir partagé de nombreux moments avec moi. Enfin, merci pour votre amour et votre gentillesse sans bornes.

Merci à toutes les personnes que j'ai connu mais que je n'ai pas pu citer.

Merci.

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

1^{ère} partie: Synthèse bibliographique

Historique.....	2
------------------------	----------

I. Généralités.....	3
----------------------------	----------

I.1. Histologie de la peau	3
----------------------------------	---

I.2. Pourquoi réalise-t-on une biopsie de la peau ?.....	4
--	---

I.3. Quand réalise-t-on une biopsie de la peau ?.....	4
---	---

II. Immunofluorescence directe (IFD) cutanée.....	4
--	----------

II.1. Définition	4
------------------------	---

II.2. Principes de la réaction d'immunofluorescence directe (IFD) cutanée :	4
---	---

II.3. Marqueurs fluorescents ou fluorochromes.....	5
--	---

II.4. Types de l'immunofluorescence directe (IFD) cutanée.....	5
--	---

II.5. Difficultés de la technique	6
---	---

II.6. Sensibilité de l'IFD et contrôle positif.....	6
---	---

II.7. Spécificité de l'IFD et contrôle négatif.....	7
---	---

II.8. Inconvénients de l'IFD cutanée	7
--	---

III. Maladies bulleuses auto-immunes.....	8
--	----------

III.1. Définition des maladies Cliniquement	8
---	---

III.1.1. Pemphigoïde	8
----------------------------	---

III.1.2. Pemphigus.....	9
-------------------------	---

III.1.2.1. Types de pemphigus	10
-------------------------------------	----

III.1.3. Lupus.....	11
---------------------	----

III.1.4. Lichen plan.....	12
---------------------------	----

III.1.5. Psoriasis	13
III.1.6. La sclérodermie.....	13
III.1.7. Prurigo.....	13
III.1.8. Dermatose à IgA linéaire	13
III.1.9. La dermatite herpétiforme.....	14
III.1.10. Les vascularites	14
III.2. Histologie de l'IFD dans les maladies	14
III.2.1. Pemphigoïde bulleuse	14
III.2.2. Pemphigus.....	15
III.2.3. Dermatite herpétiforme	15
III.2.4. Lupus.....	16

2^{ème} partie: Matériel et méthodes

I. Réalisation de la biopsie	17
II. Histologie standard	18
II.1. Obtention des coupes	18
II.2. Colorations.....	19
II.3. Etude en microscopie optique	19
III. Technique de l'immunofluorescence directe cutanée (IFD)	19
III.1. Siège du prélèvement.....	19
III.2. Fixation et transport du fragment biopsié.....	20
III.2.1. Transport	20
III.2.2. Fixation	20
III.2.3. Réalisation de la technique de l'IFD cutanée	20
III.3. Lecture des coupes.....	21

3^{ème} partie: Résultats et discussion

I. Résultats statistiques	22
I.1. Sexe	22

I.2. Groupes	23
a. Répartition du groupe 1	23
b. Répartition du groupe 2	25
c. Répartition du groupe 3.....	25
I.3. Sensibilité et spécificité de l'IFD	26
Conclusion.....	27
Références bibliographiques	28

ABREVIATION

<i>AC</i>	: Anticorps
<i>Ag</i>	: Antigène
<i>CHU</i>	: Centre hospitalier universitaire
<i>IF</i>	: Immunofluorescence
<i>IFD</i>	: Immunofluorescence directe
<i>IFI</i>	: Immunofluorescence indirecte
<i>UV</i>	: Ultraviolet
<i>FITC</i>	: Isothiocyanate de fluorescéine
<i>PITC</i>	: Isothiocyanate de rhodamine
<i>DH</i>	: Dermatite herpétiforme
<i>P</i>	: Pemphigus
<i>PB</i>	: Pemphigoïde bulleuse
<i>PC</i>	: Pemphigoïde cicatricielle
<i>PF</i>	: Pemphigus foliacé
<i>PG</i>	: Pemphigoïde gestationnelle
<i>PPN</i>	: Pemphigus para néoplasique
<i>PV</i>	: Pemphigus vulgaire
<i>DIgAL</i>	: Dermatose à IgA linéaire
<i>HE</i>	: Hématéine-éosine
<i>HES</i>	: Hématéine-éosine-safran
<i>LP</i>	: Lichen plan

Introduction

La diversité des maladies de la peau couvre l'ensemble des disciplines et spécialités médicales. Le dermatopathologiste se voit confronté à une variété très importante de pathologie qui sont les maladies infectieuses, les tumeurs, les génodermatoses mais, aussi des pathologies de pays étrangers, sans compter sur les différents tissus affectés par ces pathologies dermatologiques, comme les muqueuses, les phanères, ou le tégument (2).

L'application de la technique d'immunofluorescence directe (IFD) aux biopsies cutanées pour y rechercher des motifs antigéniques cellulaires ou tissulaires a permis d'améliorer le diagnostic des maladies bulleuses (3,4), des maladies auto-immunes et des vascularites (5,6).

Le principe de la technique consiste à déposer un anticorps spécifique de l'antigène recherché sur la lame de biopsie cutanée coupée en congélation. Pour visualiser le complexe antigène + anticorps, on utilise un colorant fluorescent (fluorochrome) qui prend une couleur verte ou rouge à l'examen au microscope équipé d'une lampe UV.

La congélation immédiate du tissu biopsié est nécessaire pour préserver les sites antigéniques que les fixateurs usuels dénaturent. Les cinq anticorps utilisés en routine détectent l'IgA, l'IgG, l'IgM, le C3 et le C1q.

Après avoir présenté l'ultrastructure de la peau et la technique de l'IFD cutanée, nous exposerons les résultats obtenus au laboratoire d'Anatomie pathologique du CHU Hassan II de Fès sur une durée de 4 années de 2010 à 2013 dont le but d'évaluer l'apport de l'IFD dans l'orientation du diagnostic.

1ère partie

Synthèse bibliographique

Historique

Les racines de l'immunofluorescence remontent à 1929 lorsque Kendall et Heidelberger utilisèrent pour la première fois des protéines marquées dans leurs travaux d'immunologie.

Il s'ensuivit alors plusieurs travaux (travaux de HOPKINS et WORMALL, et de MARRACK) en vue de marquer des antigènes et des anticorps à l'aide de protéines colorées. Mais qui se soldèrent tous par des échecs à cause de la très faible intensité de coloration au microscope optique.

En 1941, COONS et COLL utilisèrent un traceur fluorescent, l'isocyanate de fluorescéine, dont la fluorescence était jaune-verdâtre. Mais étant instable, ce traceur doit être préparé avant chaque utilisation. Ce qui a amené à son abondant au bénéfice de l'isothiocyanate de fluorescéine, plus stable, par RIGGS et COLL.

La technique d'immunofluorescence trouva alors rapidement de nombreuses applications, bactériologiques, virologiques et parasitologiques. Et la première fois qu'elle fut appliquée en dermatologie était dans les années cinquante par RAPPAPORT.

En 1964, BEUTNER et JORDON mirent en évidence des anticorps circulants anti-épidermiques dans le pemphigus.

En 1967, JORDON décéla l'existence d'anticorps anti-membrane basale dans le sérum et la peau de malades atteints de pemphigoïde bulleuse. Ces travaux permirent de penser raisonnablement qu'un mécanisme auto-immun était en cause dans le pemphigus et dans la variété dite pemphigoïde bulleuse de la maladie de Duhring-Brocq. D'autre part, ils renforcèrent singulièrement la théorie dualiste de la maladie de Duhring-Brocq, les autoanticorps anti-membrane basale étant uniquement retrouvés dans la variété pemphigoïde et jamais dans la variété herpétiforme (1).

I. Généralités

I.1. Histologie de la peau

La peau est l'enveloppe du corps. Elle est en continuité avec les muqueuses recouvrant les cavités naturelles de l'organisme. C'est le plus gros organe de l'être humain, représentant un tiers du poids de l'organisme et une surface de l'ordre de 2m² chez un adulte.

Elle est composée approximativement de 70% d'eau, de 27% de protéines, de 2% de lipides et près de 1% d'oligoéléments. La structure de la peau est complexe. Elle se subdivise en trois couches superposées. Une couche stratifiée superficielle, l'épiderme, qui repose sur un tissu de soutien, le derme. La couche profonde ou hypoderme est aussi appelée tissu sous-cutané (7). Ces trois grands étages sont le siège d'annexes cutanées (figure 1) :

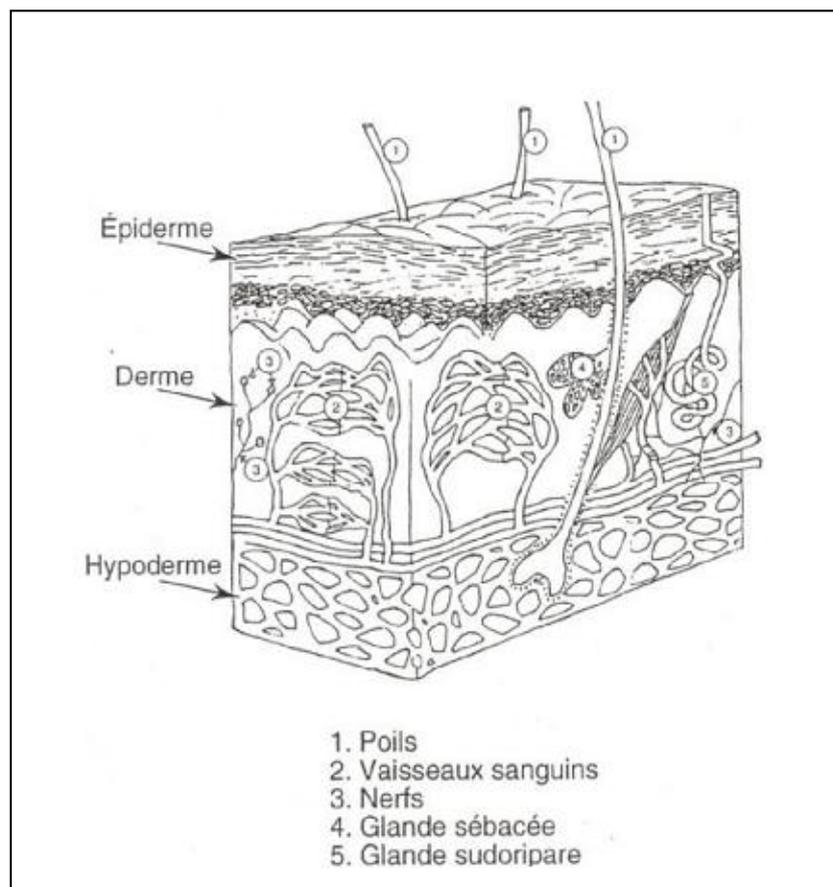


Figure 1 : Coupe schématique montrant les différents constituants du tissu Cutané (8).

I.2. Pourquoi réalise-t-on une biopsie de la peau ?

La biopsie de peau consiste à prélever un fragment de peau afin de l'analyser au microscope et d'identifier ainsi des éléments susceptibles de confirmer ou d'orienter le diagnostic. La peau étant un organe facilement accessible, il s'agit d'un geste très courant et très fréquemment réalisé en dermatologie (9).

I.3. Quand réalise-t-on une biopsie de la peau ?

La biopsie cutanée est faiblement invasif, habituellement sans danger et techniquement à la portée de tous. Il s'agit donc d'un geste largement pratiqué en dermatologie où les indications sont assez larges, dépassant le strict cadre des suspicions de lésions cancéreuses. Ainsi, les tumeurs cutanées représentent environ 60% des indications et les maladies inflammatoires ou autres les 40% restants (10).

II. Immunofluorescence directe (IFD) cutanée

II.1. Définition

L'immunofluorescence directe est une technique de marquage immuno-histochimique, qui consiste à révéler des motifs antigéniques, présents sur une structure cellulaire ou tissulaire, par application d'anticorps (AC) spécifiques du motif antigénique à révéler, rendu préalablement fluorescents par couplage à un fluorochrome. Les (AC) se fixent sur l'antigène (Ag) et persistent après lavage de la préparation (11, 12, 13, 14 et 15). Les cinq anticorps utilisés en routine détectent les Ig A, les Ig G, les Ig M, les C1q et les C3.

Il faut opposer l'immunofluorescence directe à l'immunofluorescence indirecte (IFI), qui s'effectue à partir d'un sérum du malade à la recherche d'anticorps circulants.

Notre étude ne concernera que l'immunofluorescence directe cutanée.

II.2. Principes de la réaction d'immunofluorescence directe (IFD) cutanée :

L'immunofluorescence directe cutanée fait intervenir deux acteurs principaux: les motifs antigéniques recherchés sur la biopsie cutanée et les anticorps spécifiques marqués qui servent à leurs identifications (16,17).

II.3. Marqueurs fluorescents ou fluorochromes

Les fluorochromes sont des substances qui, excitées par la lumière ultraviolet (UV), émettent un rayonnement fluorescent visible. Ils sont couplés de façon covalente à l'anticorps spécifique et permettent, ainsi, de repérer le site de fixation de l'anticorps sur le motif antigénique recherché. Le microscope à fluorescence montre les motifs du tissu examiné grâce à un discret phénomène d'autofluorescence tissulaire, mais le motif antigénique où s'est fixé l'anticorps fluorescent apparaît beaucoup plus brillant et plus net (contraste net entre l'Ag recherché et le tissu voisin).

Les deux fluorochromes les plus utilisés sont l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) qui donne une fluorescence jaune verdâtre à 517 nanomètres, et l'isothiocyanate de rhodamine (RITC) qui donne une fluorescence rouge orangée à 580 nanomètres (11, 12).

II.4. Types de l'immunofluorescence directe (IFD) cutanée

L'IFD peut être à une ou plusieurs couches (Figure 2) (13):

- L'IFD à une couche : l'anticorps (AC), révélant le motif antigénique recherché, est lui-même marqué par la fluorescéine.

- L'IFD à deux couches : l'anticorps révélant le motif antigénique n'est pas marqué, il est révélé par un deuxième anticorps lui-même marqué par la fluorescéine

- La méthode sandwich : destinée à objectiver un AC fixé dans un tissu, utilise dans un premier temps, l'antigène spécifique à cet AC qui se fixe sur lui, et dans un deuxième temps, les anticorps marqués révélateurs spécifiques de cet antigène.

- ❖ Le double marquage utilise simultanément deux anticorps différents de spécificité distincte, l'un marqué à la fluorescéine, l'autre à la rhodamine.

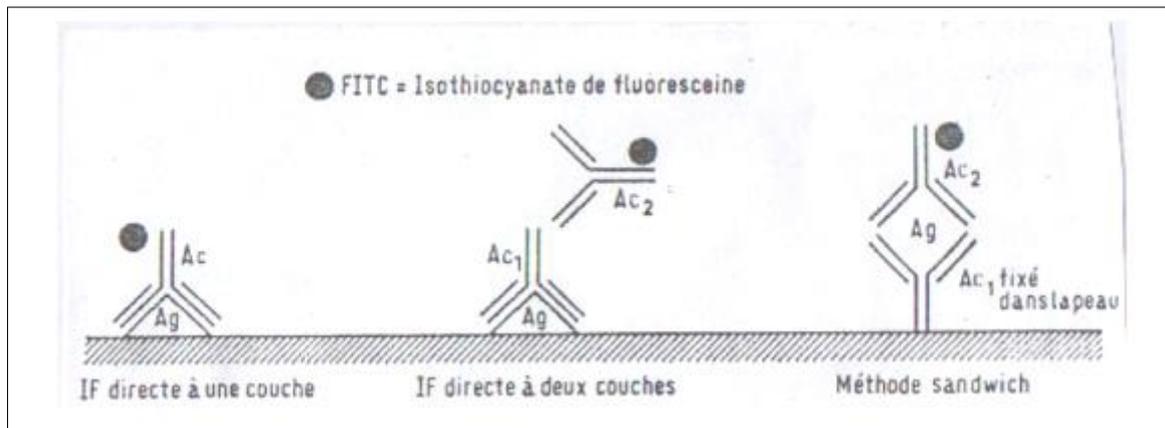


Figure 2 : Schéma des types de l'IFD cutanée (18).

II.5. Difficultés de la technique

Le marquage doit être spécifique. On doit donc :

- Faire des témoins/contrôles négatifs et positifs pour s'en assurer,
- Etablir la spécificité de l'anticorps par des témoins : l'anticorps doit identifier une seule molécule, avoir une bonne affinité pour les tissus.
- Accéder aux sites antigéniques qui sont rares et enfouis dans les tissus. (méthodes de démasquage des sites antigéniques).
- Préserver les sites antigéniques.

II.6. Sensibilité de l'IFD et contrôle positif

La sensibilité de l'IFD est définie par la quantité minimale de motifs antigéniques pouvant être détectée 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 » (11, 19).

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 (20).

II.7. 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 (20).

II.8. Inconvénients de l'IFD cutanée

L'IFD cutanée présente quelques inconvénients auxquels on pourrait remédier (11, 12) :

- Nécessité d'utiliser des tissus frais et congelés.
- Décroissement rapide de la fluorescence lors de l'exposition des coupes à la lumière UV, peut être partiellement palliée par l'utilisation de milieux de montage spéciaux contenant des agents antioxydants, comme la p-phénylène diamine ou le n-propylgallate.
- Absence d'examen histologique conventionnel de la coupe, auquel on peut remédier par la coloration de la coupe congelée par l'hématoxyline-éosine-safran. Mais la qualité des coupes obtenues après fixation dans le liquide de formol reste meilleure, d'où la pratique simultanée de l'histologie conventionnelle et de l'IFD.
- Présence relativement fréquente, au sein des tissus, de substances fluorescentes pouvant être confondues avec la fluorescence spécifique. Une contre coloration au bleu d'Evans efface en grande partie ces fluorescences parasites.
- Coût élevé.

III. Maladies bulleuses auto-immunes

Les maladies bulleuses auto-immunes constituent un groupe hétérogène de maladies à la fois très diverses, peu fréquentes et de pronostic variable, parfois sévère. Elles sont secondaires à des lésions de différents constituants de la peau : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique ou le derme superficiel. Ces lésions résultent d'une réaction auto-immune et ont pour conséquence clinique la formation de bulles cutanées ou des muqueuses externes (21).

III.1. Définition des maladies Cliniquement

Cliniquement les maladies bulleuses auto-immunes se caractérisent comme suivant :

III.1.1. Pemphigoïde

a. Pemphigoïde bulleuse

La pemphigoïde bulleuse (PB) est une maladie de la peau qui se caractérise par l'apparition de bulles de grande taille. Les lésions sont situées principalement sur les membres et sont souvent à l'origine de démangeaisons intenses (prurit). C'est une maladie d'origine auto-immune, ce qui signifie que l'organisme, suite à un dérèglement du système immunitaire, produit des anticorps contre la peau (auto-anticorps).

Elle peut s'agir d'une maladie grave non contagieuse, qui nécessite habituellement un traitement de longue durée (22).



Figure 3 : Pemphigoïde bulleuse : bulles tendues sur base érythémateuse

(Face interne de la cuisse) (23).

b. Pemphigoïde gestationnelle

La pemphigoïde gestationnelle (PG) est une dermatose vésiculo-bulleuse rare, survenant au cours de la grossesse. Le diagnostic est évoqué par la localisation et le type d'éruption ainsi que par la survenue de poussées successives(24).

c. Pemphigoïde cicatricielle

La pemphigoïde cicatricielle (PC) est une dermatose bulleuse sous-épidermique rare caractérisée par la fréquence de l'atteinte muqueuse, en particulier oculaire, et l'évolution cicatricielle des lésions, pouvant ainsi menacer le pronostic fonctionnel (visuel) (21).

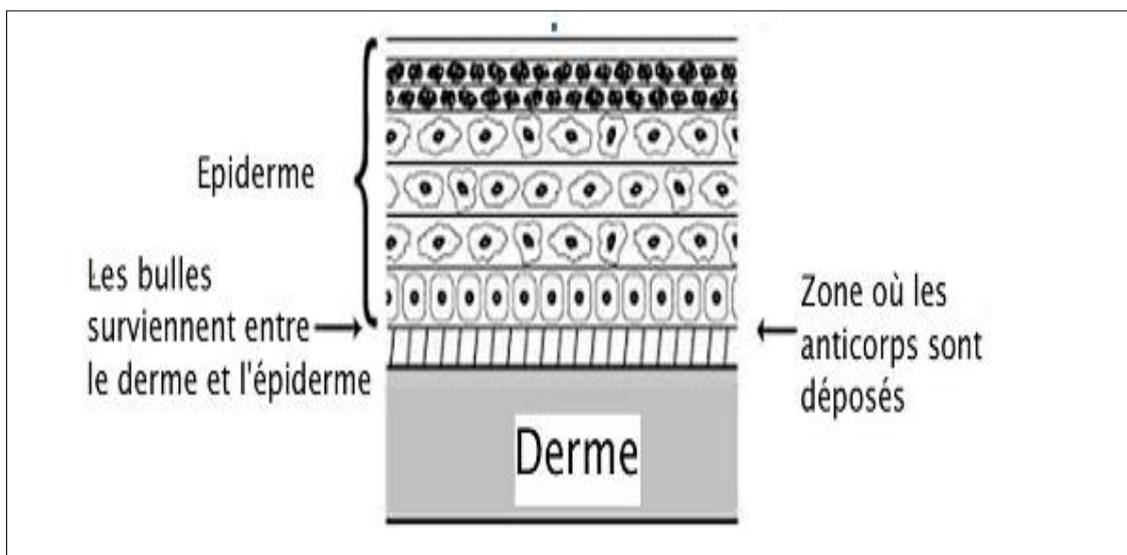


Figure 4: Schéma représentant la couche profonde de la peau (le derme) et la couche superficielle (L'épiderme) (25).

III.1.2. Pemphigus

Les pemphigus (P) sont des maladies de la peau et de muqueuses, des structures qui tapissent la bouche, les narines, la gorge, l'œsophage, les muqueuses génitales ou anales. Ils se caractérisent par l'apparition de bulles appelées : « ampoules, phlyctènes ou cloques » et de plaies douloureuses.

Il s'agit d'une maladie non contagieuse, parfois grave nécessitant un traitement durant plusieurs années (26).

III.1.2.1. Types de pemphigus

Tous les pemphigus se caractérisent par la formation de bulles. Les manifestations sont cependant différentes en fonction de la forme du pemphigus :

a. Pemphigus vulgaire

Le pemphigus vulgaire (PV) se manifeste par des bulles qui se percent quasi immédiatement après leur apparition et laissent des plaies souvent douloureuses. Il touche les muqueuses et toutes les zones de la peau (en particulier le thorax) (26).



Figure 5 : Pemphigus vulgaire (23).

b. Pemphigus foliacé

Le pemphigus foliacé (PF) ou superficiel se manifeste par des bulles qui s'assèchent rapidement et qui sont donc rarement visibles. Apparaissent alors plutôt des croûtes ou des plaies qui peuvent démanger. Cette forme ne touche que la peau.



Figure 6: Pemphigus superficiel : lésions érythémato-squameuses à bordure figurée (23).

c. Pemphigus paranéoplasique

Le pemphigus paranéoplasique (PPN) est une forme extrêmement rare qui n'apparaît que chez les malades souffrant de certains cancers.

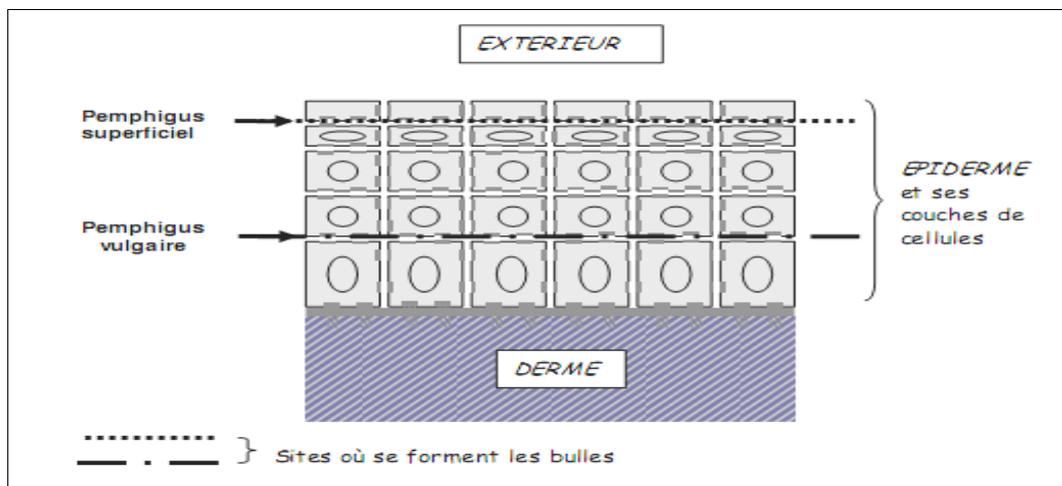


Figure 7 : Schéma représentant la localisation des différents types de pemphigus au niveau des couches de la peau (27).

III.1.3. Lupus

Le lupus est une maladie chronique, qui survient lorsque le [système immunitaire](#) s'attaque aux cellules de l'organisme et les détruit, touchant de nombreuses parties du corps dont les articulations de : la peau, les reins, le cœur, etc..., c'est la raison pour laquelle on parle de lupus disséminé ou « systémique ».

Il peut causer des symptômes aussi différents que des poussées de fièvre inexplicables, des douleurs et un gonflement des articulations, des troubles de la vision et bien d'autres (28).

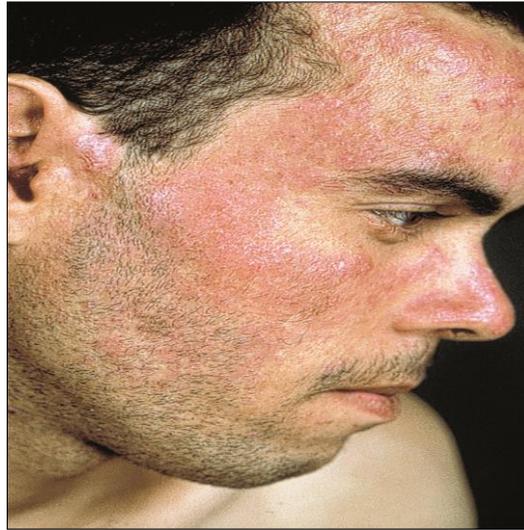


Figure 8 : Aspects cliniques du lupus érythémateux disséminé.
Érythème du visage touchant les pommettes
et le front (30).

III.1.4. Lichen plan

Le lichen plan (LP) est caractérisé par des papules de couleur brunâtre ou violine, recouvertes de petites stries blanchâtres en réseau (Figure 9), ces papules prédominent à la face antérieure des poignets, des avant-bras, des coudes, des genoux, de la région lombaire, de façon symétrique.



Figure 9: Exemple du Lichen Plan. (31)

III.1.5. Psoriasis

Le psoriasis est une dermatose de cause inconnue et d'évolution chronique dont les localisations habituelles, très caractéristiques de l'affection, sont surtout les zones exposées aux frottements : coudes et bord cubital de l'avant-bras; genoux ; jambe ; région lombosacrée ; cuir chevelu ; ongles. (31)

Le psoriasis n'est pas contagieux et régresse sans laisser de cicatrice.



Figure 10 : Exemple du Psoriasis du cuir chevelu. (32)

III.1.6. La sclérodermie

La sclérodermie est une maladie auto-immune rare du tissu conjonctif caractérisée par un durcissement anormal de la peau et, parfois, d'autres organes. La cause exacte de la sclérodermie n'est pas connue. La maladie est due à une réaction auto-immune qui provoque une surproduction localisée de collagène. (31)

III.1.7. Prurigo

Le mot prurigo désigne certaines affections de la peau (dermatose), se caractérisant par la présence de papules (petites surélévations de la peau), relativement volumineuses et recouvertes généralement d'une petite croûte sombre, tirant sur le noir, et due aux lésions de grattage (excoriations). (31)

III.1.8. Dermatose à IgA linéaire

La dermatose à IgA linéaire est une maladie bulleuse de la jonction dermo-épidermique caractérisée Cliniquement, elle se caractérise typiquement par des vésicules

oudes bulles disposées en rosettes sur peau saine. Elle est plus fréquente chez l'adulte et l'enfant. (33)

III.1.9. La dermatite herpétiforme

La dermatite herpétiforme (DH) est une dermatose bulleuse peu fréquente, qui touche les adultes d'âge moyen et se caractérise typiquement par une éruption microvésiculeuse très prurigineuse des fesses et des faces d'extension des membres. (33)

III.1.10. Les vascularites

Ce terme désigne un groupe de maladies caractérisées par :

- des lésions inflammatoires des parois artérielles, liées à la présence de complexes immuns, circulants ou formés sur place.
- un contexte général associant un syndrome inflammatoire et des anomalies immunitaires, plus ou moins intenses selon l'étiologie.

III.2. Histologie de l'IFD dans les maladies bulleuses

L'observation de certaines maladies au microscope optique équipé d'une source de rayonnement UV et de filtres d'excitation, montre les résultats suivants:

III.2.1. Pemphigoïde bulleuse

La figure montre un dépôt linéaire d'IgG continu le long de la membrane basale de l'épiderme. Toutes les pemphigoïdes : bulleuse (PB), cicatricielle (PC), gestationis (PG), réalisent des dépôts d'IgG et C3, occasionnellement d'IgA de faible intensité.

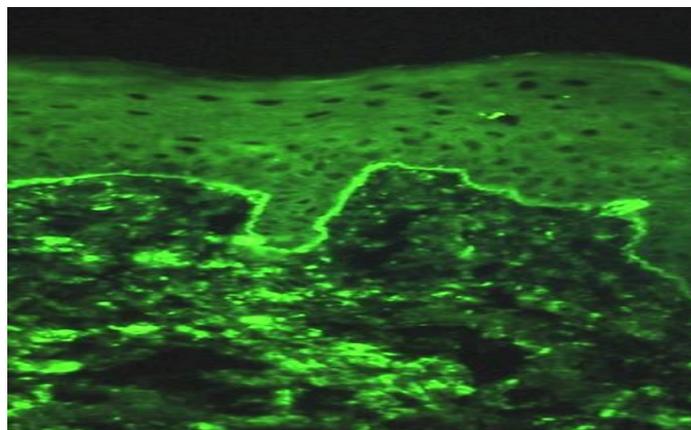


Figure 11 : Aspect de l'IFD dans la pemphigoïde. (35)

III.2.2. Pemphigus

Pour poser le résultat de l'IFD, l'observation montre que les pemphigus réalisent un dépôt interkératinocytaire d'IgG le long de la membrane basale.

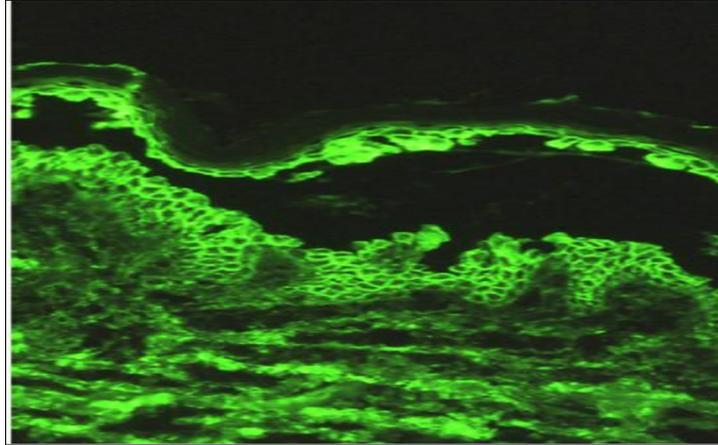


Figure 12 : Aspect de l'IFD dans le Pemphigus. (35)

III.2.3. Dermatitis herpétiforme

Les dermatites herpétiformes se spécifient par un dépôt fluorescent au sommet des papilles dermiques d'IgA à la jonction dermo-épidermique (figure 13).

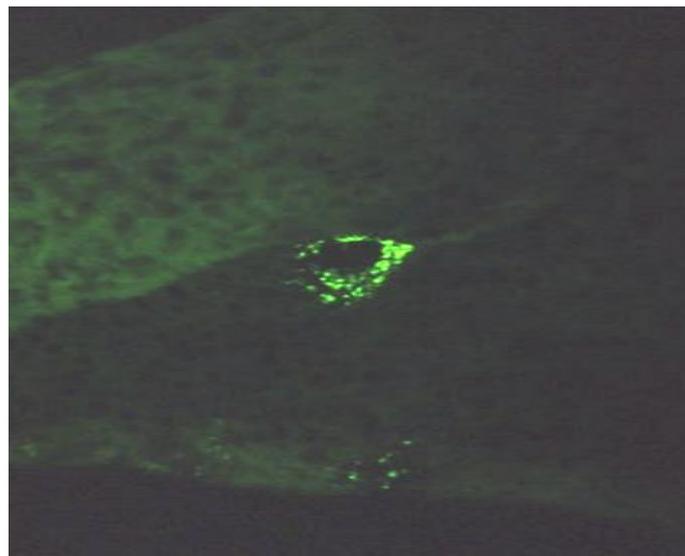


Figure 13 : Aspect de l'IFD dans la Dermatitis herpétiforme. (35)

III.2.4. Lupus

Les lupus montrent une fluorescence granuleuse de la jonction dermo-épidermique en réalisant une bande lupique d'IgM en peau lésée. (figure 14).

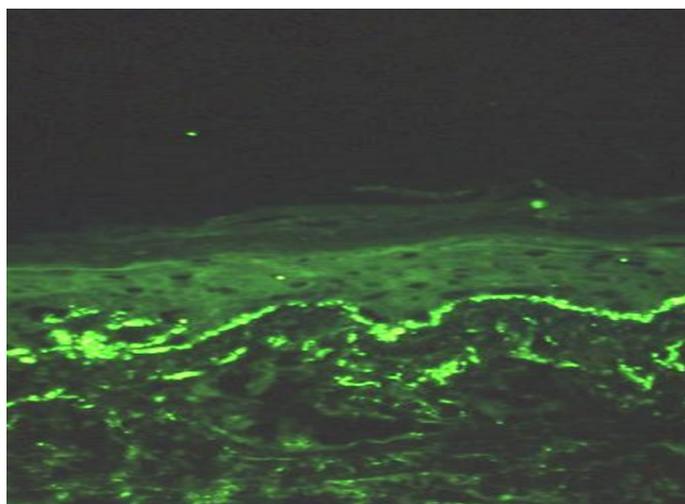


Figure 14 : Aspect de l'IFD dans le Lupus discoïde. (35)

2^{ème} partie

Matériel et méthodes

L'application de l'IFD est faite sur 150 biopsies cutanées qui ont été reçues au service d'anatomopathologie, et ceci sur 4 ans de 2010 à 2013, la réalisation de la technique passe par différentes étapes :

I. Réalisation de la biopsie

Une biopsie ne doit être ni trop petite (difficulté de l'examen anatomo-pathologique), ni trop grande (en moyenne 1,5 x 0,5 cm ou bien 2 x 0,5 cm). N'oublions pas qu'il y a une rétraction importante de la peau dans le fixateur. Le fragment biopsique va spontanément perdre 30 à 50 % de son volume apparent.

Le patient est allongé pour la réalisation de cette biopsie cutanée. On réalise une anesthésie locale de la zone à biopsier, après nettoyage à l'alcool à 70°; ou avec un autre antiseptique.

L'anesthésie locale est faite avec la xylocaïne à 1 % adrénalinée par plusieurs petites injections superficielles autour de la zone qui va être prélevée.

Pour faire la biopsie, on pince l'extrémité par des pinces à petits griffes en plein milieu de ce fragment, car on risque d'écraser la zone la plus intéressante à voir au microscope, les bords de la biopsie sont coupés d'un trait net avec le bistouri.

Pour toutes les biopsies cutanées, on doit ensuite suturer les bords aseptiquement avec fil et aiguille et un nombre suffisant de points de suture pour éviter un lâchage de ces mêmes points de suture qui entraînerait une cicatrice disgracieuse.

On met un petit pansement pour protéger la zone biopsiée, à changer tous les deux ou trois jours après nettoyage "doux" de la cicatrice par un antiseptique usuel. Les fils sont à retirer en moyenne quinze jours après la biopsie avec une pince à disséquer et de petits ciseaux.

II. Histologie standard

Les différents prélèvements reçus au service d'anatomopathologie, passent par une série de préparations:

II.1. Obtention des coupes

➤ Fixation:

La fixation a pour but de s'opposer à la déshydratation prématurée des cellules et surtout à la putréfaction des tissus.

Deux fixateurs sont utilisés:

- ❖ Solution de formol à 10 %, c'est le plus utilisé car il permet une bonne étude immunohistochimique.
- ❖ Solution de Bouin aqueux.

➤ Déshydratation:

L'échantillon tissulaire est fixé, puis progressivement déshydraté par passages successifs dans des solutions alcooliques de plus en plus concentrées jusqu'à ce que toute l'eau (des tissus et du milieu de fixation) ait été soustraite et que l'échantillon soit totalement imprégné d'alcool absolu. L'alcool est ensuite remplacé par un solvant organique dans lequel peuvent se dissoudre à la fois l'alcool et la paraffine (la paraffine n'est pas soluble dans l'alcool)

➤ Inclusion en paraffine chauffée:

L'échantillon est alors immergé dans de la paraffine chauffée à une température dépassant juste son point de fusion, puisque celle-ci est solide à température ambiante.

➤ Refroidissement:

Une fois l'échantillon bien imprégné, on le laisse refroidir dans un moule rempli de paraffine qui se solidifie.

➤ Réalisation de coupes:

En se refroidissant, le fragment, imbibé de paraffine, se trouve inclus dans un bloc solide à partir duquel, grâce à un microtome comportant un rasoir, des coupes de 5 microns d'épaisseur sont obtenues.

➤ Réhydratation:

Une fois les plans de coupe réalisés, ils sont déposés sur une lame de verre et la paraffine est dissoute par un solvant organique avant un temps de réhydratation par des solutions alcooliques de plus en plus diluées. Quand la réhydratation est achevée, les coupes sont colorées.

II.2. Coloration

La coloration la plus communément réalisée est l'HE (hématoxyline-éosine) ou l'HES (hématoxyline-éosine-safran). Les noyaux sont colorés en bleu-violet, les cytoplasmes en rose, le tissu conjonctif en rouge-rosé (HE) ou jaune-orangé (HES).

II.3. Etude en microscopie optique

L'observation des coupes colorées est effectuée à l'aide d'un microscope optique. Cet appareil permet d'obtenir une image agrandie (20 à 1000 fois) par une combinaison optique de la coupe éclairée.

III. Technique de l'immunofluorescence directe cutanée (IFD)

III.1. Siège du prélèvement

La qualité du prélèvement est fondamentale pour un examen en IFD. Les biopsies doivent être suffisamment larges (3 à 5 mm) et profondes (jusqu'à l'hypoderme) faites au bistouri ou au trépan, et le site biopsique doit varier en fonction du diagnostic.

Ainsi, dans les maladies bulleuses, la biopsie doit être faite au niveau de la peau périlésionnelle (et non la bulle elle-même), à quelques millimètres du bord de la bulle (ne dépassant pas un centimètre), généralement en peau saine.

III.2. Fixation et transport du fragment biopsié

III.2.1. Transport

Dés que le prélèvement biopsique est réalisé, l'acheminement au Laboratoire d'Anatomie Pathologique peut se faire de deux manières (14, 21, 29) :

- Immédiatement (Laboratoire à proximité) dans une compresse imbibée de sérum physiologique.

- Dans du liquide de Michel qui est un milieu de transport spécial (Solution de sulfate d'ammonium tamponnée). Ce milieu permet d'acheminer vers le laboratoire spécialisé le fragment biopsique à température ambiante pendant plusieurs jours (deux à dix jours), donnant des résultats comparables à l'acheminement immédiat. Avant d'être fixé, le fragment sera rincé avec une solution tampon neutre.

III.2.2. 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 -70°C .

La congélation est une étape indispensable à la préparation des échantillons à étudier, elle a pour but (14) :

- 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.

III.2.3. Réalisation de la technique de l'IFD cutanée

La biopsie cutanée congelée est sectionnée en coupes de 4 à 6 microns au cryostat, puis les coupes sont placées sur lames et congelées à -50°C (21, 26, 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 $+4^{\circ}\text{C}$.

- Sécher les coupes 2 mn à l'air.
- 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-IgM, anti-C3, et anti-C1q. 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.

III.3. Lecture des coupes

L'observation se fait au microscope optique équipé d'une source de rayonnement UV et de filtres d'excitation et d'arrêt convenable pour le type de fluorochrome utilisé. La fluorescence observée est labile, imposant la photographie des aspects significatifs et un équipement en conséquence du microscope à fluorescence.

3^{ème} partie

Résultats et discussion

I. Résultats statistiques

150 biopsies cutanées ont été reçu au service d'anatomopathologique du CHU HASSAN II, pour étude en IFD, et ceci sur 4 ans de 2010 à 2013 .Nous avons analysé les données cliniques, histologiques, et celles de l'IFD, ainsi que leurs corrélations.

L'immunofluorescence directe est une technique qui permet de détecter la présence de complexes immuns au niveau de la biopsie cutanée, et ceci à différents niveaux (interkératinocytaire, jonction dermo-epidermique, linéaire...), permettant ainsi de confirmer ou d'exclure les diagnostics cliniques et histologiques.

Le but de l'étude est d'évaluer l'apport de l'IFD dans l'orientation diagnostique pour le dermatologue.

Nous avons réparti les statistiques selon :

le sexe et en trois groupes de résultat d'IFD (IFD positive et négative, faux négatifs et IFD sans aucun apport).

I.1. Sexe

Sur les 150 cas enregistrés, on a trouvé 100 femmes ce qui correspond à 67.3% et 50 hommes dont le pourcentage est de 32.7% (figure 14). La moyenne d'âge était de 51,5 ans, avec des extrêmes allant de 7 ans à 100 ans.

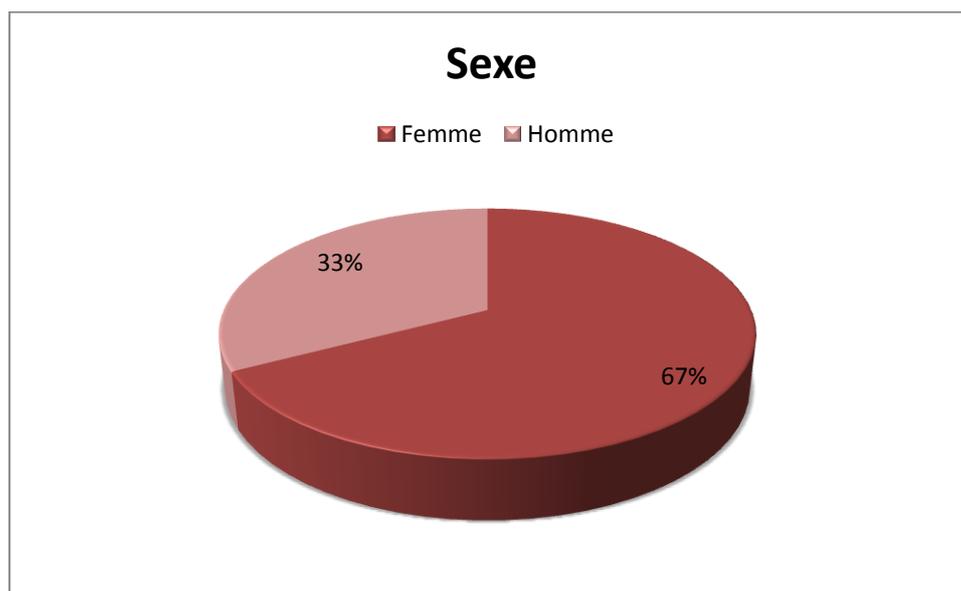


Figure 14 : Graphique montrant la répartition du résultat d'IFD selon le sexe.

I.2. Groupes de résultat d'IFD

L'étude statistique sur 150 biopsies a été subdivisée en trois groupes :

Groupes	1	2	3
Nombre de biopsie cutanée	73	35	42

a. Répartition du groupe 1

Les 73 cas de biopsie avaient montré une bonne corrélation clinique-IFD avec 66 cas d'IFD positive ce qui correspond à 44% et 7 cas négative correspond à 4.66%, les figures 15, 16 et 17 illustrent les résultats obtenus.

- ❖ L'IFD est dite « positive » lorsqu'il existe un dépôt immun au niveau de la peau. Elle permet de conclure le diagnostic final. Les IFD positives représentent 66 cas.
- ❖ Une IFD cutanée « négative » se définit par l'absence de dépôts immuns au niveau de la peau. Les IFD négatives étaient au nombre de 7 cas et représentent 10%. Ils ont permis d'éliminer une maladie bulleuse auto-immune réconfortant ainsi le diagnostic clinique.

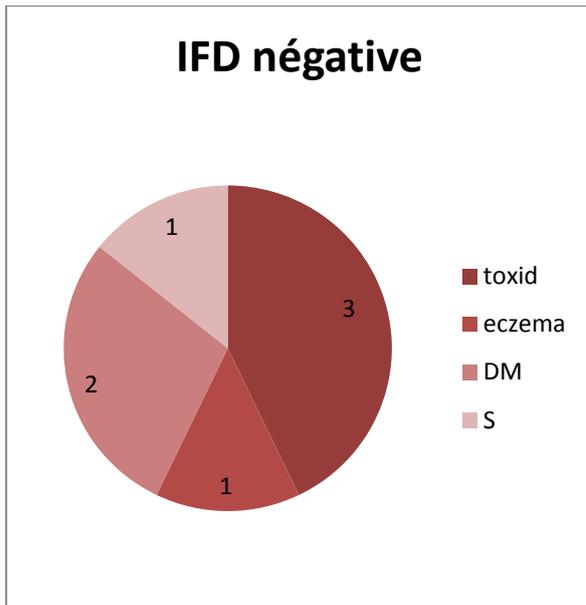


Figure 15 : Graphique montrant la répartition des maladies où l'IFD est négative.

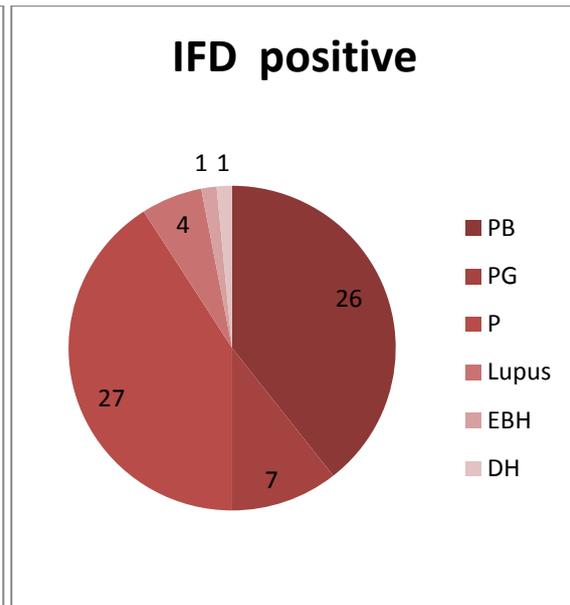


Figure 16 : Graphique montrant la répartition des maladies où l'IFD est positive.

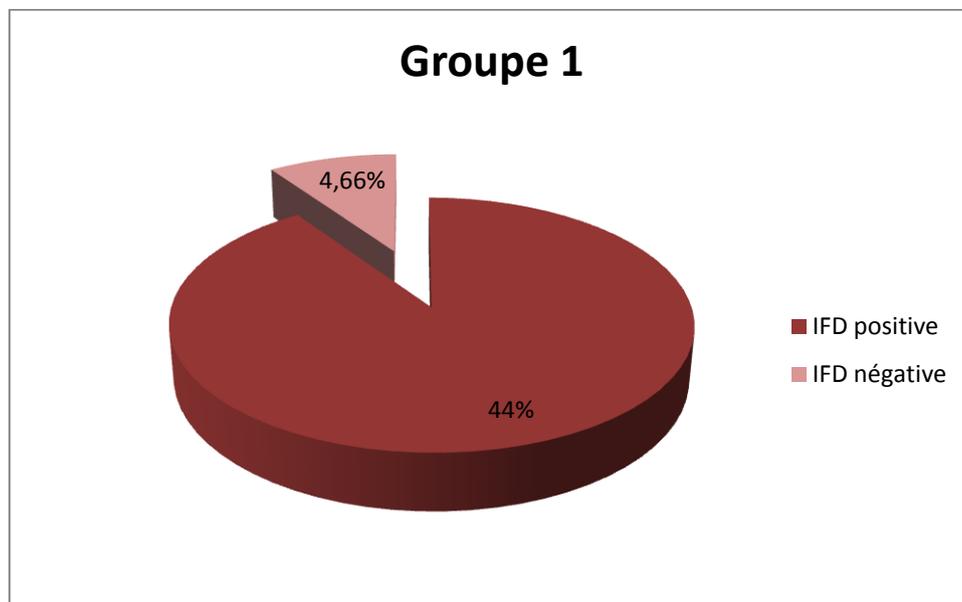


Figure 17 : Graphique montrant la répartition de l'IFD positive et négative.

b. Répartition du groupe 2

Le deuxième groupe correspondait à 35 cas de faux négatifs avec un pourcentage de 23.4%, La figure (18) montre le résultat :

les faux négatifs ont été retenus après une bonne confrontation clinico-histo-immunologique qui s'impose pour poser le bon diagnostic final. Ils peuvent être expliqués par plusieurs facteurs intervenant dans l'échec de la technique ,à savoir le site du prélèvement au niveau d'une zone ensoleillée ou non,l'ancienneté des lésions,l'application préalable d'un traitement ainsi que les conditions d'acheminement et de stockage.

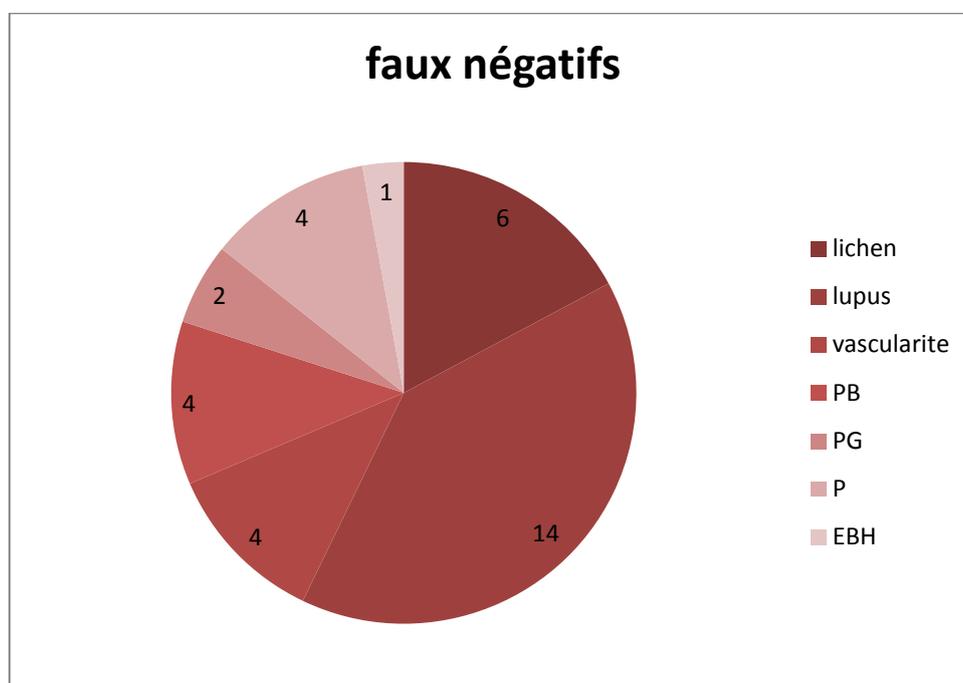


Figure 18 : Graphique montrant la répartition des maladies présentant des faux négatifs.

b. Répartition du groupe 3

Le troisième groupe (42 cas) ,correspond à 28% où l'IFD n'était d'aucun apport, et c'est l'histologie qui a permis de poser le diagnostic.

I.3. Sensibilité et spécificité de l'IFD

Dans notre étude, la meilleure sensibilité était de 87% pour les pemphigus et 86% pour la pemphigoïde bulleuse, alors que la spécificité était de 67.2% et 66.6% respectivement.

- ❖ La sensibilité de l'application de l'IFD mesure sa capacité à donner un résultat positif lorsqu'une hypothèse est vérifiée. Notre résultat donne la meilleure sensibilité pour le pemphigus et la pemphigoïde bulleuse.

Alors que sa spécificité mesure la capacité d'un test à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée.

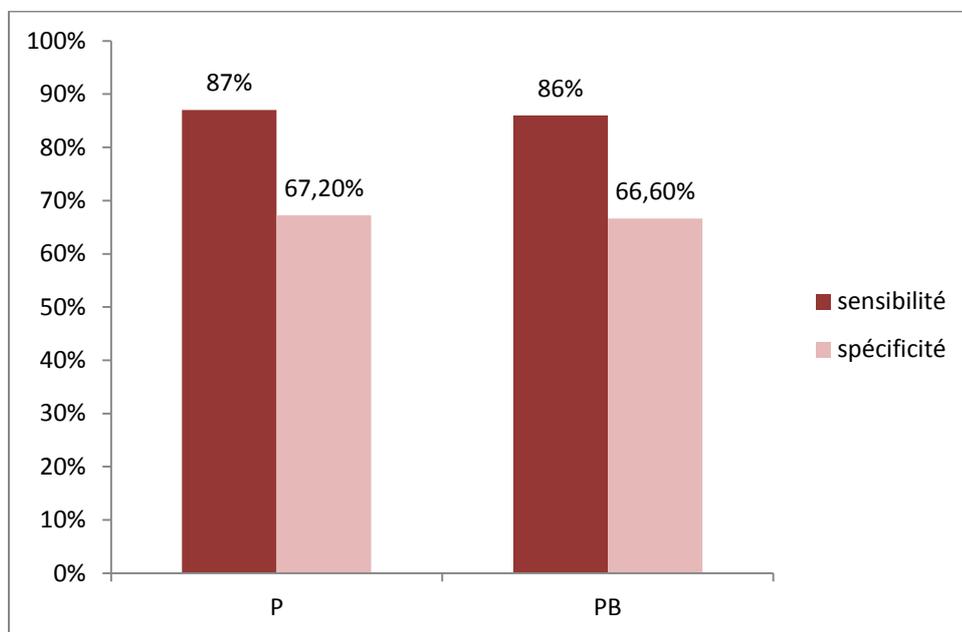


Figure 19 : Graphique montrant sensibilité et la spécificité de l'IFD.

Conclusion

L'IFD permet de caractériser les antigènes en fonction de leur localisation cutanée (épidermique, sous épidermique ou vasculaire). En effet, elle permet de révéler des motifs antigéniques présents sur la peau par application d'anticorps spécifiques marqués, et donc de classer les maladies ayant un mécanisme immunologique selon la nature et le siège de ces anticorps fixés.

L'application de la technique d'immunofluorescence directe (IFD) aux biopsies cutanées, pour y rechercher des motifs antigéniques cellulaires ou tissulaires, a permis d'améliorer le diagnostic des maladies bulleuses auto-immunes.

Dans notre étude, on a travaillé sur 150 cas de biopsies cutanées reçues au service d'anatomopathologie du CHU HASSAN II, pour l'application de l'IFD et ceci sur 4ans de 2010 à 2013. Notre étude statistique montre que ces maladies sont plus fréquentes chez les femmes avec un pourcentage de 67.3% par rapport aux hommes qui révèlent 32.7% . l'âge moyen est de 51 ans.

La valeur diagnostique de l'IFD signifie le degré de contribution de cette technique dans l'élaboration du diagnostic final retenu. Dans notre étude, les faux négatifs représentent 23.4%. La meilleure corrélation clinico-immunologique était rencontré dans les dermatoses bulleuses.

Son apport était faible pour le lupus car la bande lupique n'était rencontrée que dans certains cas, avec aucun apport en matière de lichen et de vascularite.

Devant la multiplicité des diagnostics différentiels en dermatologie, une bonne confrontation clinico-histo-immunologique s'impose pour poser le bon diagnostic et offrir la meilleure prise en charge.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

1: BEUTNER E. The development of immunofluorescence and the immunopathology of the skin. *International Journal of Dermatology* 2003; 42 : 99-109

2: Philippe HUMBERT ; Dermatopathologie W. KEMPF, M. HANTSCHKE, H. KUTZNER, W.H.C. BURGDORF, R.G. PANIZZONSPRINGER

ISBN : 9782287996689Nb pages : 299

3: Mihai S, Sitaru C. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. *J Cell Mol Med* 2007;11:462—81.

4: Morrison LH. Direct Immunofluorescence microscopy in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. *Clin Dermatol* 2001;19:607—13.

5: Morrison LH. When to request immunofluorescence: practical hints. *Semin Cutan Med Surg* 1999;18:36—42.

6: Kanitakis J, Vassileva S, Woodley D. Diagnostic Immunohistochemistry of the Skin. London: Chapman & Hall Medical; 1998,230pp.

7: CRIBIER B, GROSSHANS E. Histologie de la peau normale et lésions histopathologiques élémentaires. *Encycl Méd Chir* 1994 ; 12-220-A-10.

8: BEUTNER E, BAUGHMAN R, AUSTIN B.

A case of dermatitis herpetiformis with IgA endomysial antibodies but negative direct immunofluorescent findings. *J AM Acad Dermatol* 2000; 43; 2 : 329-332.

11: KANITAKIS J, CLAUDY A. Immunopathologie cutanée. *Encycl méd chir* 2000; 98-090-A-10.

12: KOEPEL M. Immunopathologie cutanée. *Encycl méd chir* 2-1989; 1222 A10.

13: MUTASIM D, PELC N. Established methods in the investigation of bullous diseases. *Dermatologic clinics* 1993; 11; 3: 399-418.

14: NGPP, TANSI, TANT. Lupus erythematosus panniculitis: a clinicopathologic study. *Int J Dermatol* 2002; 41; 8: 488-9.

15: PARODI A, CAPRONI M. Clinical, histological and immunopathological features of 58 patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Dermatology* 2000; 200: 6-10.

16: BEUTNER E. The development of immunofluorescence and the immunopathology. *International Journal of Dermatology* 2003; 42 : 99-109 .

17: VASSILEVA S. Immunofluorescence in dermatology. *International Journal of Dermatology* 1993; 32; 3: 153-161.

18: CHAN L. Human skin basement membrane in the health and in autoimmune diseases. *Front Biosci* 1997; 15; 2 : 343-352.

19: MORRISON L. When to request immunofluorescence: practical hints. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 1999;18; 1: 36-42.

20: SELASSI DINA. Pemphigus : mise au point thérapeutique. Thèse méd Casablanca 1997 ; 229.

21: HAUTE AUTORITE DE SANTE ; GUIDE MEDECIN-AFFECTION DE LONGUE DUREE ; Maladies bulleuses auto-immunes . Pemphigoïde cicatricielle. Protocole national de diagnostic de soins pour les maladies rares. Janvier 2011. Guide médecin – PNDS « Maladies bulleuses auto-immunes Pemphigoïde cicatricielle » -.

22: La pemphigoïde bulleuse. Encyclopédie Orphanet Grand Public www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/PemphigoïdeBulleuse-FRfrPub8663v01.pdf | Septembre 2008.

23: Item 116 : Dermatoses bulleuses auto-immunes. Collège National des Enseignants de Dermatologie. Date de création du document 2010-2011.

24: [ELANI Amina](#), [ATOUANI Atika](#) , [ANSARI Anas Chenguiti](#) , [MALKI YOUSFI Mounia](#) , [BELGHITI Leila](#), [EL AMRAN Sabahi](#), [OUAZZANI Charaf Taïbi](#). Service de gynécologie-obstétrique c - Maternité de souissi, rabat, MAROC. 2004, vol. 82, n°12, pp. 1128-1133 [6 page(s) (article)] (17 ref.).

25: Extrait du site de l'International Pemphigus Foundation .

26: Fiche d'information aux patients atteints de pemphigus.

27: Schéma d'après C Prost-Squarcioni

28: Item 117 - Lupus érythémateux disséminé. Syndrome des antiphospholipides. Collège National des Enseignants de Dermatologie. Date de création du document 2010-2011.

29: Collection diapotheque COFER.

30: Collection J. Sibia Strasbourg.

31: Item 329 : Prurit

32: Item 123 : Psoriasis ; Collège National des Enseignants de Dermatologie

33: HAUTE AUTORITE DE SANTE ; Maladies bulleuses auto-immunes Dermatose à IgA linéaire , Protocole national de diagnostic et de soins, pour les maladies rares Janvier 2011.

34: Module Intégré 3 , Appareil locomoteur , LES VASCULARITES SYSTEMIQUES, Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.

35: Annales de dermatologie et de vénéréologie (2009) 136, 175—181 ; B. Balme , M. Grossin , Hôpital Hôtel-Dieu, Lyon, France , Hôpital universitaire Louis-Mourier, université Paris-7, 178, rue des Renouillers, AP—HP, 92701 Colombes cedex, France Disponible sur Internet le 30 janvier 2009.

Sites webographiques :

9, 10: http://dermato-info.fr/article/Les_biopsies_de_peau