



**Département de Biologie**

**Projet de fin d'études**

**Licence sciences et techniques**

**Sciences biologiques appliquées et santé**

**(LST-SBAS)**

*Les techniques utilisées dans un  
laboratoire d'anatomie et cytologie  
pathologique*

**Présenté par : Youssef Zemmouri**

**Encadré par : Pr. Rachida Tlemçani (FST Fès)**

***Dr. Souaf Ihsan (Centre el Yosr)***

**Soutenu le : Mercredi 7 Juillet 2021**

**Devant le jury composé de : Pr. Tlemçani Rachida**

***Pr. Bekhti Khadija***

***Dr. Souaf Ihsan***

**Stage effectuée à : Centre el Yosr d'anatomie et cytologie pathologique**

***Année universitaire : 2020/2021***

## *Dédicace*

**A mes chers parents**, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien, et leurs prières tout au long de mes études.

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

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

## *Remerciements*

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à mon professeur **Mr Haloti Said**, qui m'a beaucoup aidé dans ma recherche de stage.

J'exprime mes remerciements à **Mme Rachida Tlemçani** pour son encadrement pédagogique et pour son aide.

Je tiens à remercier vivement mon encadrante de stage au sein du laboratoire, **Docteur Ihsan Souaf**, pour son accueil et le partage de son expertise au quotidien.

Je remercie également les techniciennes du laboratoire pour m'avoir aidé pendant mon stage, et pour les informations et les conseils qu'elles m'ont donné.

Je remercie le professeur Mme Bekhti Khadija pour m'avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté de juger mon travail.

# Table des matières

<b>I. Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Intérêt de l'anatomie pathologique .....</b>	<b>1</b>
<b>III. Différents types de prélèvements.....</b>	<b>2</b>
• <b>Prélèvements cytologiques .....</b>	<b>3</b>
• <b>Prélèvement tissulaire.....</b>	<b>3</b>
<b>IV. Qualité des prélèvements cellulaires/tissulaires et enregistrement .....</b>	<b>4</b>
• <b>Qualité des prélèvements cellulaires et tissulaires.....</b>	<b>4</b>
• <b>Enregistrement.....</b>	<b>4</b>
<b>V. Examens effectués en anatomie pathologique .....</b>	<b>5</b>
a) <b>Examen histologique sur tissu fixé.....</b>	<b>5</b>
1. <b>La fixation .....</b>	<b>5</b>
2. <b>Etude macroscopique .....</b>	<b>6</b>
3. <b>La circulation .....</b>	<b>6</b>
4. <b>L'inclusion .....</b>	<b>7</b>
5. <b>La microtomie.....</b>	<b>8</b>
6. <b>Déparaffinage.....</b>	<b>9</b>
7. <b>Hydratation.....</b>	<b>9</b>
8. <b>Coloration.....</b>	<b>9</b>
9. <b>Le montage .....</b>	<b>11</b>
a) <b>Examen cytologique .....</b>	<b>11</b>
b) <b>Examen extemporané .....</b>	<b>13</b>
<b>VI. L'immunohistochimie .....</b>	<b>14</b>
1. <b>Définition de l'immunohistochimie.....</b>	<b>14</b>
2. <b>But et principe de l'immunohistochimie.....</b>	<b>14</b>
3. <b>Les anticorps utilisés .....</b>	<b>16</b>
4. <b>Méthodes de coloration.....</b>	<b>17</b>

<b>5. Applications de la technique .....</b>	<b>17</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>18</b>

## **Liste d'abréviations**

**HE : Hématoxyline-éosine**

**FCV : Frottis cervico-vaginal**

**OG6 : L'orange G**

**EA50: L'éosine-azur**

**PBS: Phosphate buffered saline**

**HRP : Horseradish peroxidase**

**DAB : Diaminobenzidine**

**CEA : Antigène carcino-embryonnaire**

**CD 15: Cluster of differentiation 15**

**CD 30: Cluster of differentiation 30**

**CD117: Cluster of differentiation 117**

**Ki-67: Antigène Ki-67**

**CK7: Cytokeratin 7**

**TTF1: Thyroid transcription factor-1**

**Her2: Human epidermal growth factor receptor 2**

## Présentation de la structure d'accueil



Centre El Yosr est un laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologique inauguré par Dr. Ihsan Souaf à Fès.

Il se compose d'une salle de réception, de prélèvements, de macroscopie, d'une salle technique (histologie et cytologie), d'une salle d'immunohistochimie, et d'une salle de lecture.

Ce centre d'anatomie pathologique traite des examens cytologiques (liquides) et histologiques (biopsies et pièces opératoires) demandés par les différents médecins et chirurgiens spécialistes.

Le laboratoire se charge des prélèvements de biopsies, de pièces opératoires et de frottis cytologiques en utilisant certaines techniques dans le but de donner les facteurs pronostiques.

## **I. Introduction générale**

L'anatomie pathologique, ou anatomopathologie, informellement abrégée en « anapath » dans le jargon des professionnels de la santé, est une discipline médicale qui étudie les lésions des tissus et des cellules provoquées par la maladie. C'est la partie de la pathologie consacrée à l'étude morphologique des anomalies macroscopiques et microscopiques des tissus biologiques et des cellules pathologiques prélevés sur un être vivant (ou mort).

Les lésions peuvent être observées l'œil nu (lésions macroscopiques), au microscope optique (histopathologie et cytopathologie) ou au microscope électronique (lésions ultrastructurales). La lésion est toute modification non physiologique, macroscopique ou microscopique, d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe. Elles sont reconnues par comparaison avec les structures normales. L'étude microscopique permet également la mise en évidence dans les cellules ou les tissus de certains composés chimiques (histochimie), d'enzymes (histoenzymologie) et de constituants antigéniques précis (immunohistochimie).

Au cours de mon stage, mon objectif a été d'observer de façon permanente et de suivre les diverses techniques effectuées au sein du laboratoire pour avoir une idée sur les procédures de ces techniques depuis le prélèvement jusqu'au résultat final.

## **II. Intérêt de l'anatomie pathologique**

L'anatomie pathologique a pour but d'analyser les prélèvements de tissus, et d'établir ou de confirmer un diagnostic. Cette spécialité médicale étudie, plus précisément, les lésions des tissus biologiques.

Les médecins anatomopathologistes reçoivent des pièces à analyser, envoyées par d'autres spécialistes. L'anatomopathologiste étudie le type de cellules, le type de tissu, son caractère cancéreux ou non cancéreux. D'ailleurs, seul l'examen anatomopathologique permet de confirmer ou non la nature cancéreuse de la lésion.

L'anatomopathologie vise à identifier toute modification morphologique d'un tissu biologique, qu'elle soit liée à une pathologie inflammatoire, dégénérative, génétique, tumorale, ou autre. Cette modification sera évaluée à l'œil nu, donc de manière macroscopique, et de manière microscopique, via des méthodes d'histopathologie.

L'anatomie pathologique présente un intérêt majeur pour l'identification des maladies. De nombreuses affections (cancers par exemple) ne peuvent être reconnues avec précision que par l'examen au microscope d'un fragment de la lésion (histopathologie) ou d'un étalement de cellules isolées (cytopathologie). Cette étude apporte également des informations précieuses sur l'extension des lésions par l'examen des pièces opératoires (organes ou tissus prélevés lors d'une intervention), permettant ainsi de choisir le traitement le plus approprié.

### **Buts de l'anatomie pathologique dans la pratique médicale**

Le rôle de l'anatomocytopathologie 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 anatomopathologiques sont renouvelés au cours d'un traitement afin de juger de la disparition, de la persistance ou de l'aggravation des lésions.

### **III. Différents types de prélèvements**

Différents prélèvements peuvent être l'objet d'une analyse anatomocytopathologique :

- liquides, frottis
- Prélèvements bronchiques, gynécologiques et ponctions
- biopsies
- pièces opératoires

On distingue les prélèvements ramenant :

- Uniquement des cellules (**examen cytologique**)
- Des cellules et du tissu de soutien (**examen histologique**).

- **Prélèvements cytologiques**

Les prélèvements cytologiques se présentent sous forme de cellules isolées, ou de petits amas cellulaires.

Ils peuvent être obtenues de diverses façons :

- Recueil des liquides spontanément émis (urine, expectoration, fistule, drain)
- Ponction à l'aiguille d'un liquide (épanchement de séreuse ou articulaire, liquide céphalorachidien, kyste, collection)
- Ponction à l'aiguille d'un organe ou d'une tumeur (ganglion, nodule thyroïdien ou mammaire).

- **Prélèvement tissulaire**

Les prélèvements tissulaires peuvent être obtenues soit par biopsie, soit par dissection d'une pièce opératoire.

➤ **Les biopsies**

- Une biopsie est le prélèvement d'un petit fragment de tissu biologique.
- Il existe différents types de biopsies, dont on peut citer : biopsie à l'aiguille, biopsie endoscopique, biopsie exérèse et ponction-biopsie
- La valeur des biopsies repose sur :
  1. Leur taille
  2. Leur nombre ; plus elles sont nombreuses, plus on a de chance de trouver du tissu tumoral
  3. Le choix de la zone qui intéresse la biopsie
  4. La bonne préservation des tissus : ne pas étirer ou écraser les fragments

➤ **Les pièces opératoires**

- Les pièces opératoires sont des pièces obtenues par exérèse partielle ou complète d'un organe.
- Une photographie macroscopique de la pièce opératoire peut être réalisée dans la majorité des laboratoires.

## **IV. Qualité des prélèvements cellulaires/tissulaires et enregistrement**

- **Qualité des prélèvements cellulaires et tissulaires**

La qualité du prélèvement conditionne la qualité de l'étude anatomopathologique.

Tout prélèvement humain tels que pièce opératoire, biopsie (fragment tissulaire de petite taille prise au moyen d'un endoscope ou d'un scalpel), frottis ou aspiration cytologique, ponction d'organes, liquide biologique sont analysables dans le service d'anatomie pathologique. Le prélèvement est effectué dans le strict respect des conditions médicotéchniques et sanitaires visant à assurer la qualité, le suivi et la sécurité du patient.

- **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, et toutes les informations demandées doivent être transmises de manière lisible, précise et complète sur la demande d'analyse.

Ces informations comprennent :

1. L'identité du patient : nom, prénom(s), date de naissance, sexe.
2. Le siège, la date (jour et heure) et l'origine et le type du prélèvement (biopsie ou exérèse).
3. L'aspect macroscopique ou endoscopique des lésions (un compte-rendu opératoire peut être utilement joint).
4. La date de la prescription et la signature du prescripteur.
5. La date et l'heure du prélèvement.
6. Les renseignements cliniques et l'exposé du problème.

## V. Examens effectués en anatomie pathologique

### a) Examen histologique sur tissu fixé

Après recueil d'un fragment de tissu et quel que soit sa taille, l'analyse va nécessiter une coupe du matériel pour pouvoir l'examiner sur lame.

La technique de base comporte plusieurs étapes :

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

#### 1. La fixation

La fixation est une étape essentielle dans la préparation tissulaire et indispensable pour conserver la morphologie cellulaire. Son but est de s'opposer à l'autolyse tissulaire et à la putréfaction, et 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 prélèvements sont fixés dans du formol à 10%. La fixation doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement.
- Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomopathologique difficile voire impossible à cause de la dessiccation ou l'autolyse du tissu.
- Le volume du fixateur doit représenter environ 10 fois le volume de la pièce, et la durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement ; au minimum de 2 à 5 heures pour une biopsie, et 48 heures pour une pièce opératoire.
- Le récipient doit être de taille suffisamment grande pour prévenir les déformations des pièces opératoires volumineuses.
- Cas particulier des tissus calcifiés ; : les prélèvements calcifiés (os, certaines tumeurs) doivent être sciés, puis fixés, puis plongés dans une solution décalcifiante (acide nitrique) avant d'être inclus dans la paraffine.

## **2. Etude macroscopique**

L'étude macroscopique est basée sur l'examen à l'œil nu d'une pièce opératoire. C'est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire ; la pièce est examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée.

Lors de la dissection d'une pièce opératoire, le pathologiste choisit les territoires lui semblant représentatifs des lésions. Il décrit et mesure la tumeur, son extension locale, dénombre les ganglions et étudie les limites de l'exérèse.

Le prélèvement est décrit et mesuré, ensuite, il est mis en partie ou en totalité dans une cassette plastique. Les fragments de petite taille (biopsie etc...) sont mis en totalité dans la cassette, pour les grosses pièces, on sélectionne des tranches d'intérêt suivant le protocole adapté à la pathologie.

L'examen macroscopique oriente le choix et le nombre de zones qui seront prélevés pour l'étude histopathologique, et il donne des indications pour le pronostic de la maladie

## **3. La circulation**

La circulation consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires, suivant cet enchaînement :

- Fixation dans 2 bains de formol 10%
- Déshydratation par l'alcool : cette étape consiste à faire débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient.  
La déshydratation se fait dans 5 bains d'alcool de degré croissant ; 75%, 80%, 90%, 95%, et 100%.
- Eclaircissement par le toluène : cette étape est destinée à remplacer l'alcool par le toluène ; un solvant de la paraffine, et à chasser l'alcool par 3 bains successifs de toluène.  
En remplaçant l'agent déshydratant, le toluène rend le tissu transparent, d'où le nom d'éclaircissement.
- Enrobage dans la paraffine : c'est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans 2 bains de paraffine liquide.

<b><i>Bain 1</i></b>	Formol	30min
<b><i>Bain 2</i></b>	Formol	30min
<b><i>Bain 3</i></b>	Alcool 75%	1h
<b><i>Bain 4</i></b>	Alcool 80%	1h
<b><i>Bain 5</i></b>	Alcool 90%	1h
<b><i>Bain 6</i></b>	Alcool 100%	1h
<b><i>Bain 7</i></b>	Alcool 100%	2h
<b><i>Bain 8</i></b>	Toluène	1h
<b><i>Bain 9</i></b>	Toluène	1h30min
<b><i>Bain 10</i></b>	Toluène	1h30min
<b><i>Bain 11</i></b>	Paraffine	2h
<b><i>Bain 12</i></b>	Paraffine	2h

**Tableau 1**



**Histokinette ; L'appareil de circulation (Figure 1)**

#### **4. L'inclusion**

L'inclusion a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltré. Ainsi, les tissus acquièrent une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome.

La paraffine ; substance d'inclusion, 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 est remplacé par le toluène (substitution). Ces dernières étapes étant réalisées dans l'appareil de circulation.

Après l'inclusion, on met les blocs sur une plaque refroidie à  $-10^{\circ}\text{C}$ , et puis on démoule les blocs. 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 représenté par la figure si jointe.



*Appareil d'inclusion (ou d'enrobage) dans la paraffine (Fig. 2)*

### *5. La microtomie*

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, après montage du bloc dans le porte-bloc du microtome. On a ainsi la production de fines coupes ou rubans de  $3\mu\text{m}$  à  $5\mu\text{m}$  à l'aide de cet appareil.

Ces coupes sont étalées sur des lames couverts en alcool, et puis flottées à la surface d'un bain chaud de gélatine.



*Microtome (Fig. 3)*

## 6. Déparaffinage

Pendant cette étape, les lames sont mises dans l'étuve à 70°C pendant une heure, puis plongées dans le toluène.

Le déparaffinage consiste à enlever la paraffine de la coupe tissulaire ; grâce à l'action du toluène, pour que les colorants préparés en phase aqueuse, puissent pénétrer le tissu et le colorer.

## 7. Hydratation

L'hydratation 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 de l'eau.

## 8. 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 la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, le plus souvent désignée sous sa forme abrégée **coloration HE**.

La coloration HE est une technique de coloration d'usage courant en histologie et en histopathologie. Elle a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules.

C'est une coloration bichromatique qui se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique, l'éosine.

L'hématoxyline est un colorant basique nucléaire qui colore le noyau en bleu/violet, et l'éosine ; ou phloxine, est un colorant acide cytoplasmique qui colore le cytoplasme en rose.

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

<i><b>Bains</b></i>	<i><b>Durée</b></i>
Toluène	5min
Toluène	5min
Toluène	5min
Alcool 96%	2min
Alcool 80%	2min
Alcool 70%	2min
Eau	Rinçage
Hématoxyline	5min
Eau	5min
Eosine	passage
Eau	Rinçage
Alcool 96%	passage
Alcool 100%	passage
Alcool 100%	passage
Toluène	passage
Toluène	5min

***Tableau 2***



**Coupe du tissu étalé sur lame et coloré en hématoxyline-éosine(B) et tissu inclus en paraffine dans le bloc correspondant(A) (Fig. 4)**

### **9. Le montage**

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

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

#### **b) Examen cytologique**

Après frottis ou recueil d'un liquide, les cellules qui sont indépendantes seront étalées sur une lame avant coloration. Il n'y a pas de coupe du matériel.

Plusieurs prélèvements peuvent être étudiés :

- **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 ou de tumeurs qui sont étalés et fixés par la suite.

Les frottis sont réalisés au niveau vaginal, exocervical et endocervical, d'où le nom de **frottis cervico-vaginal (FCV)**

La technique utilisée pour le cytodagnostic est la suivante :

- Homogénéiser bien le prélèvement cytologique.
- Eliminer la brosse présente dans le flacon.
- Remplir les puits avec le liquide selon la densité des cellules :  
400µl de stikeur (liquide préservatif) +400µl du prélèvement.
- Centrifugation pendant 10 min.
- Egoutter et laisser les lames bien sécher.
- Coloration par le **Papanicolau**.
- Séchage et montage.

### *Coloration de Papanicolau*

La coloration de Papanicolaou est une coloration polychrome qui permet de différencier les cellules en fonction de leur maturité et de leur activité métabolique. C'est une coloration cytologique qui ne peut être utilisée que sur des échantillons liquides.

Le test de Papanicolaou sert surtout à détecter des modifications anormales des cellules du col de l'utérus, et qui permet ainsi de prévenir le développement du cancer du col de l'utérus.

Cette coloration est composée de trois colorants :

- **L'hématoxyline de Harris** : colore les noyaux des cellules grâce à son affinité avec l'ADN.
- **L'orange G (OG 6)** : réagit avec les cellules squameuses matures de par son affinité avec la kératine.
- **L'éosine-azur (EA 50)** : réagit avec le cytoplasme des cellules squameuses non matures, ainsi qu'avec les cellules glandulaires et les hématies.

Ainsi, on obtient les résultats suivants :

- Les noyaux des cellules sont colorés en bleu/noir.
- Le cytoplasme des cellules kératinisées est en rose/orange transparent.
- Le cytoplasme des cellules non kératinisées est en bleu/vert transparent.
- Les hématies sont en rouge.

La coloration de Papanicolaou suit le protocole suivant :

<i>Bains</i>	<i>Durée</i>
Alcool 80%	30sec
Alcool 70%	30sec
Eau	Rinçage
Hématoxyline	1min
Eau	Rinçage
Alcool 70%	30sec
Alcool 80%	30sec
Alcool 100%	30sec
OG 6	1min
Alcool 100%	2min
EA 50	10min
Alcool 100%	5min
Alcool 100%	5min
Toluène	5min

**Tableau 3**

### ***c) Examen extemporané***

C'est un examen anatomopathologique rapide réalisé le plus souvent en cours d'intervention chirurgicale dans le but de modifier un geste opératoire et de fournir un résultat en général en moins de 30 minutes.

L'examen extemporané ne doit être demandé que si la réponse a une incidence sur la conduite de l'acte en cours.

Les applications les plus fréquentes ont pour but de :

- Déterminer la nature tumorale ou non d'une lésion, modifiant le geste opératoire.
- Déterminer la nature bénigne ou maligne d'une tumeur.
- S'assurer qu'un prélèvement a bien intéressé un territoire lésionnel représentatif de la maladie.

## **VI. L'immunohistochimie**

L'immunohistochimie tire son nom de la racine « immuno », en référence à l'anticorps utilisé dans la procédure, du mot « chimie » et du mot « histologie » qui évoque l'étude de tissus biologiques.

### **1. Définition de l'immunohistochimie**

L'immunohistochimie est une méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps. L'immunohistochimie exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques. Les anticorps peuvent être d'origine polyclonale ou monoclonale, les anticorps monoclonaux étant plus spécifiques par essence.

### **2. But et principe de l'immunohistochimie**

Le but et principe de l'immunohistochimie est de mettre en évidence certaines protéines cellulaire, 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 est rendu visible et localisable par un marqueur coloré.

Un traceur fixé directement ou indirectement sur l'anticorps permet de détecter la liaison entre l'anticorps et sa cible.

L'immunohistochimie permet d'analyser et de localiser, par visualisation directe, les composants cellulaires et tissulaires.

### **Protocole de l'immunohistochimie**

<u>Déparaffinage</u> : mettre les lames dans l'étuve à 40°C pendant toute la nuit. Le lendemain augmenter la température à 20°C et les laisser 1h	
<u>Déparaffinage</u> : 1. Toluène	10min
2. Toluène	10min
3. Toluène	10min
4. Alcool 100%	5min
5. Alcool 100%	5min
6. Alcool 70%	5min
7. Alcool 70%	5min

Rincer avec PBS ; Wash buffer	2min
Démasquage à 95°C	40-45min
Refroidissement à température ambiante	20min
Rincer avec le Wash buffer	3min
Peroxydase	5min
Rincer avec le Wash buffer	3min
<b>Anticorps</b>	60min pendant l'été 30 min pendant le reste de l'année
Rincer avec le Wash buffer	3min
Linker (pour certains anticorps)	15min
Rincer avec le Wash buffer	3min
HRP	35min pendant l'été 30min pendant le reste de l'année
Rincer avec le Wash buffer	3min
DAB	8min
Rincer avec un nouveau Wash buffer	3min
Hématoxyline	30sec-1min (contrôler à l'œil nu sinon replonger jusqu'à bonne coloration)
Rincer avec le Wash buffer	1min
Rincer avec de l'eau courante	1min
<u>Déshydratation</u> : 1. Alcool 70%	1min
2. Alcool 70%	1min
3. Alcool 100%	2min
4. Alcool 100%	2min
5. Toluène	2min
6. Toluène	2min

**Tableau 4**

- Les coupes histologiques sont déposées sur lames prétraités, incubées à 40°C pendant une nuit, puis elles sont déparaffinées et réhydratées.
- Les coupes sont immergées pendant 40-45min dans une solution citrate (ph=6) ou EDTA (ph=9) préalablement chauffée à 95°C.
- Refroidissement de la solution pendant 45min à température ambiante, ensuite les lames sont rincées avec du Wash buffer pendant 3min (PBS : phosphate buffered saline).
- Ensuite, on recouvre les tissus avec la peroxydase pendant 5min, et après on rince avec le Wash buffer pendant 3min.
- Après, on applique l'**anticorps** pendant 40min (en moyenne), puis rinçage avec le Wash buffer pendant 3min. Ensuite, on recouvre les tissus avec du Linker (pour certains anticorps), et on rince avec du Wash buffer une autre fois pendant 3min.
- On applique le HRP pendant 30min, on rince avec le Wash buffer pendant 3min, et puis on incube les coupes dans le DAB (Diaminobenzidine) pendant 8min, pour révéler la réaction immunohistochimique, et ensuite on rince avec un nouveau Wash buffer pendant 3min. Les lames sont ensuite trempées dans un bain d'hématoxyline pendant 1min, et elles sont rincées après avec le Wash buffer pendant 1min. Ensuite les coupes sont rincées à l'eau courante pendant 1min, et puis déshydratées.

### 3. Les anticorps utilisés

L'immunohistochimie est largement utilisée pour le diagnostic et le suivi des cancers par détection de cellules anormales telles que celles trouvées dans les tumeurs cancéreuses.

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

- **Antigène carcino-embryonnaire (CEA)** : utilisé en cas de cancer du côlon.
- **CD15 et CD30** : utilisés pour la maladie de Hodgkin.
- **CD117** : en cas de tumeur stromale gastro-intestinale.
- **Ki67** : un des indices de prolifération tumorale.
- **CK7** : un marqueur de cirrhose biliaire primitive.
- **TTF-1** : un marqueur thyroïdien et pulmonaire.
- **Her2** : marqueur cytoplasmique.

Ces marqueurs moléculaires sont caractéristiques de certains événements cellulaires tels que la prolifération ou la mort cellulaire (apoptose).

#### **4. Méthodes de coloration**

Il existe principalement deux méthodes concernant l'immunohistochimie et la détection d'antigènes au sein des tissus biologiques :

- **La méthode directe**

La méthode directe est une méthode de coloration en une seule étape. Elle utilise un anticorps marqué qui réagit directement avec les antigènes présents dans la section tissulaire. Un seul anticorps étant utilisé, la procédure est courte et rapide. Elle manque cependant de sensibilité en raison d'une faible amplification du signal.

- **La méthode indirecte**

La méthode indirecte emploie un anticorps principal non marqué (première couche) qui réagit avec les antigènes au sein du tissu, un anticorps secondaire marqué (seconde couche) qui réagit avec l'anticorps principal. Le signal est amplifié du fait que plusieurs anticorps secondaires sont liés à un anticorps primaire unique.

#### **5. Applications de la technique**

Les applications de l'immunohistochimie sont innombrables. Parmi les plus importantes, on peut citer :

- Le diagnostic différentiel des tumeurs indifférenciées (carcinome, sarcome, mélanome, ou lymphome malin).
- La caractérisation des leucémies et des lymphomes.
- L'identification de l'origine d'une métastase.
- La détection de molécules ayant une importance pronostique et thérapeutique (récepteurs hormonaux d'un cancer mammaire par exemple).

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.

## Conclusion

L'anatomie pathologique est une spécialité médicale qui étudie les lésions des tissus et des cellules provoquées par la maladie. Son but est d'analyser les prélèvements de tissus, et d'établir ou de confirmer un diagnostic.

Différents prélèvements peuvent être l'objet d'une analyse anatomocytopathologique :

- **Prélèvements cytologiques** qui se présentent sous forme de cellules isolées, ou de petits amas cellulaires.
- **Prélèvements tissulaires** qui peuvent être obtenues soit par biopsie, soit par dissection d'une pièce opératoire.

Différents examens peuvent être effectués en anatomie pathologique :

- **Examen histologique sur tissu fixé** : L'analyse nécessite une coupe d'un fragment de tissu pour pouvoir l'examiner sur lame.  
La coloration utilisée est la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE)
- **Examen cytologique** : L'analyse nécessite l'étalement des cellules sur une lame avant coloration. La coloration Papanicolaou est utilisée.
- **Examen extemporané** : un examen anatomopathologique rapide en cours d'opération pour modifier un geste opératoire.

L'**immunohistochimie**, une autre méthode utilisée, est une technique qui permet de localiser et d'identifier des protéines.

## **Webographie**

- Centre hospitalier public du cotentin, <https://www.ch-cotentin.fr>
- Clinics in Mother and Child Health, Octobre 2006, <https://www.ajol.info>
- CliniSciences, <https://www.clinisciences.com>
- Collège Français des Pathologistes(CoPath), <http://campus.cerimes.fr>
- Médecine Sorbonne Université, <http://www.chups.jussieu.fr>
- Agnès Bourahla, Janvier 2019, Passeport santé, <https://www.passeportsante.net>

