

**TECHNIQUES D'ETUDE  
MORPHOLOGIQUE DES  
PRELEVEMENTS  
CELLULAIRES ET  
TISSULAIRES**

# Les prélèvements

- Les cellules
  - Liquides
  - Ponction aspiration
  - Frottis
- Les tissus
  - Biopsies
  - Biopsies exérèses
  - Pièces opératoires
  - Autopsie (s)

**Si vous avez un problème téléphonez au  
labo qui est en mesure  
de vous conseiller  
de vous fournir containers et flacons  
de vous fournir les fixateurs**

**Informations dans « le manuel de  
prélèvement »**

# Cytologie

# Les différents prélèvements

- Liquides
- Produits de ponction
- Frottis

# CONDITIONNEMENT : éviter l'autolyse cellulaire

- Fixation des étalements
  - Séchage pour étalements colorés par May-Grunwald-Giemsa (MGG)
    - hématologie
    - ponction d'organe profond
  - Fixation alcool absolu : SNC
  - Fixation éther-alcool : FCV
  - Cyto urinaire : mélange dans alcool à 50° volume/volume

# CONDITIONNEMENT

## ■ liquides

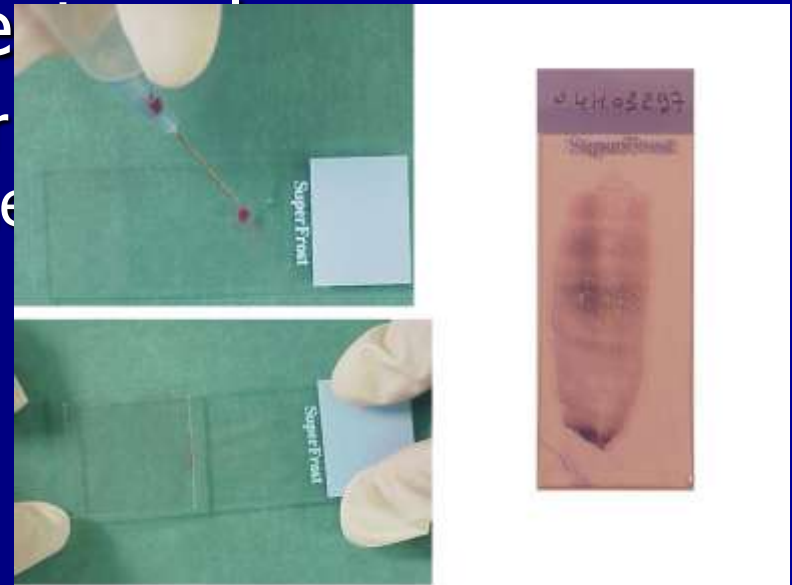
- Fixation immédiate par le préleveur (ex : FCU)
- Acheminement rapide au labo des liquides à l'état frais
- Si besoin, conserver provisoirement le liquide à 4°C
- Cyto urinaire : mélange dans alcool à 50° volume/volume

# Techniques d'étude des prélèvements cellulaires

- Technique rapide permettant d'obtenir des résultats rapides
- Mais résultats partiels, de fiabilité variable
- Valeur d'orientation +++

# Technique d'étude des prélèvements cellulaires (Cytologie)

- Techniques d'étalement
  - 1/ Étalement : fait par cytoponctions d'organes, écouvillonnages



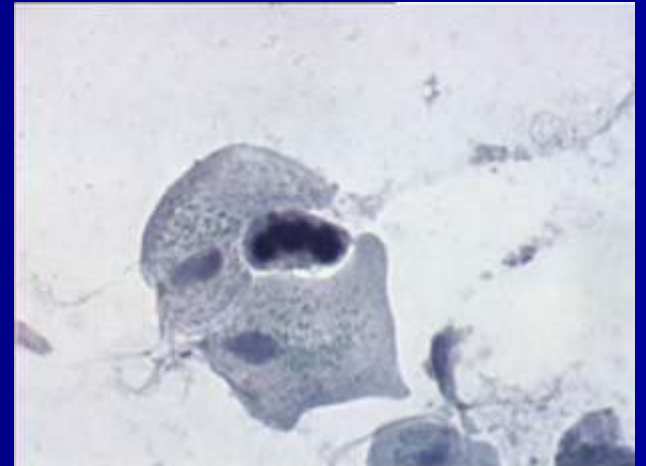
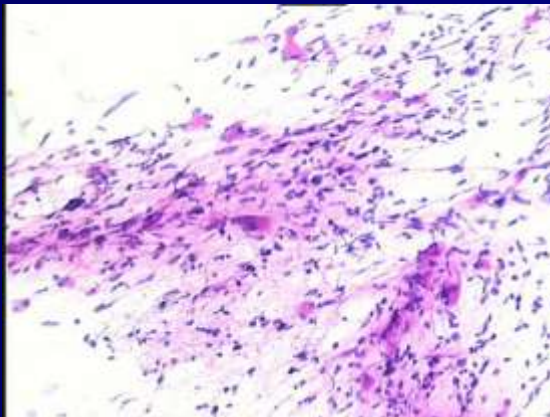
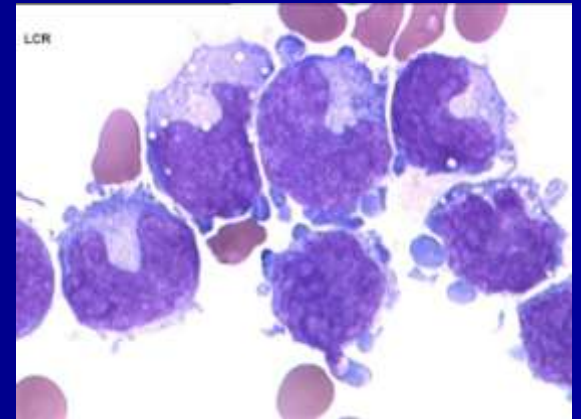
# Technique d'étude des prélèvements cellulaires

- Techniques d'étalement sur lames
  - 2/ Etalement après cyto centrifugé avant d'être



# Colorations cytologiques

- May Grundwald  
Giemsa
- Papanicolaou
- Hématoxyline  
éosine



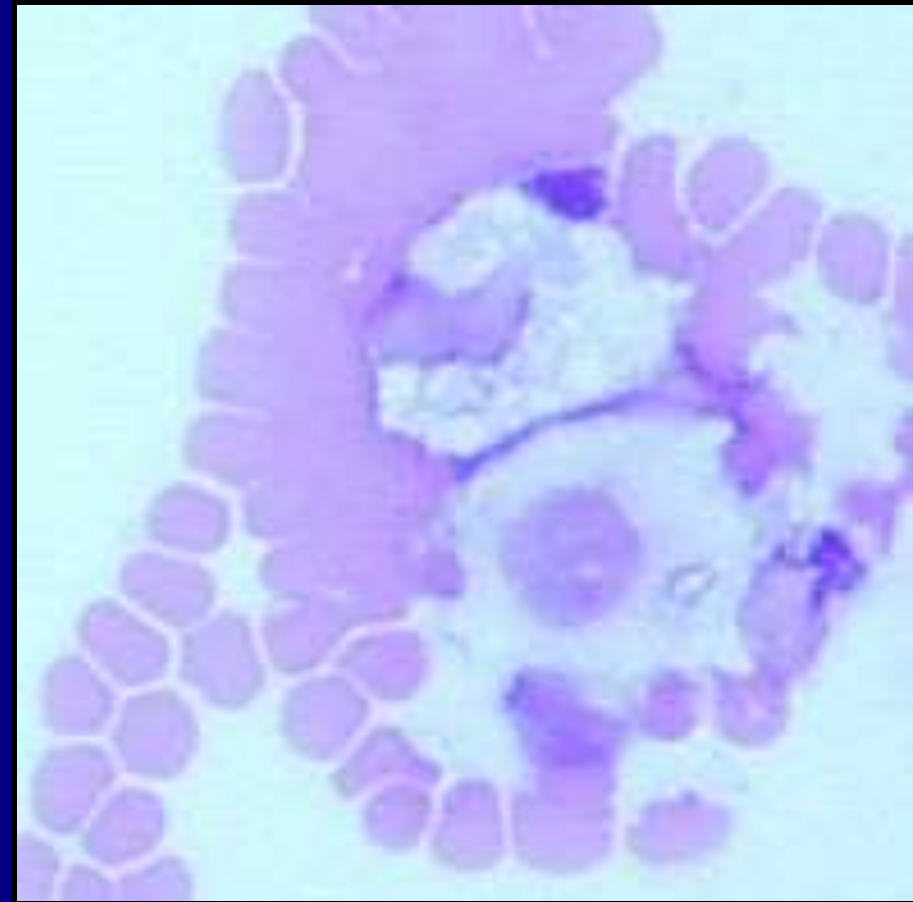
**Exemple : liquide pleural**

# Cellularité Normale

- Cellules mésothéliales
- Cellules inflammatoires:
  - Macrophages
  - Lymphocytes
  - Plasmocytes
  - PNN/PNE/PNB

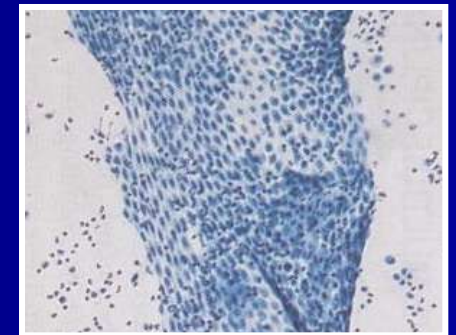
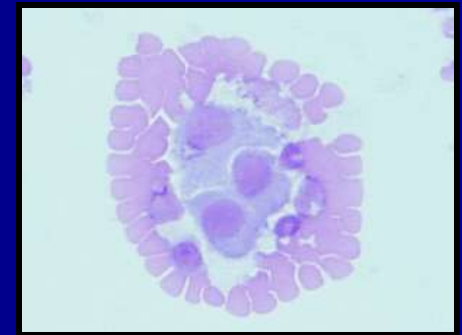
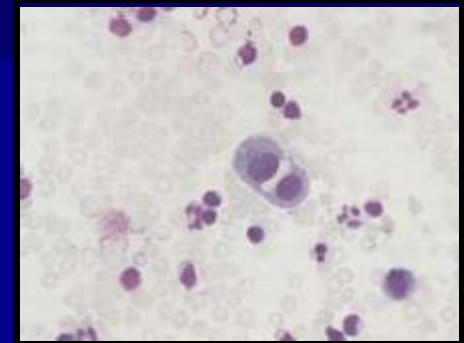
# MACROPHAGES

- Cellules isolées
- Nx
  - rond/réniforme
  - Excentré
  - Taille variable
- Chromatine fine
- +/- nucléole
- Cytoplasme
  - abondant,
  - mal limité,
  - cyanophile
  - Vacuolisation
  - Phagocytose



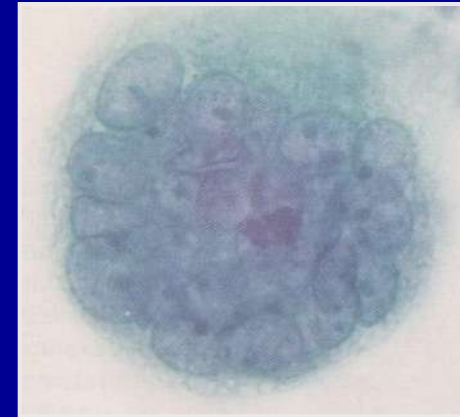
# CELLULES MESOTHELIALES

- Taille variable ( 10 à 20 microns)
- Regroupement
  - Isolé
  - Amas : rosettes, acini, placards
  - Espaces intercellulaires réguliers : fenêtre mésothéliale



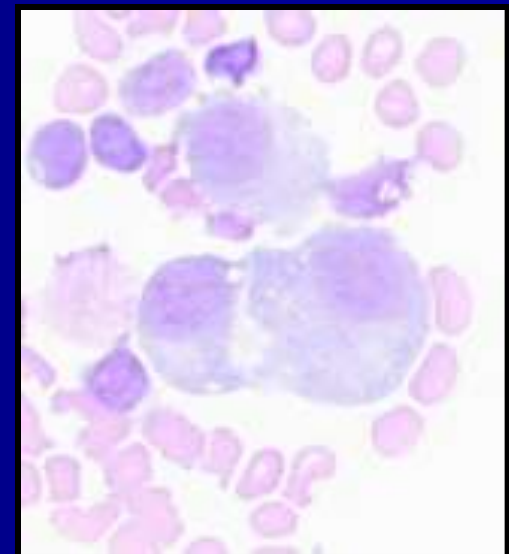
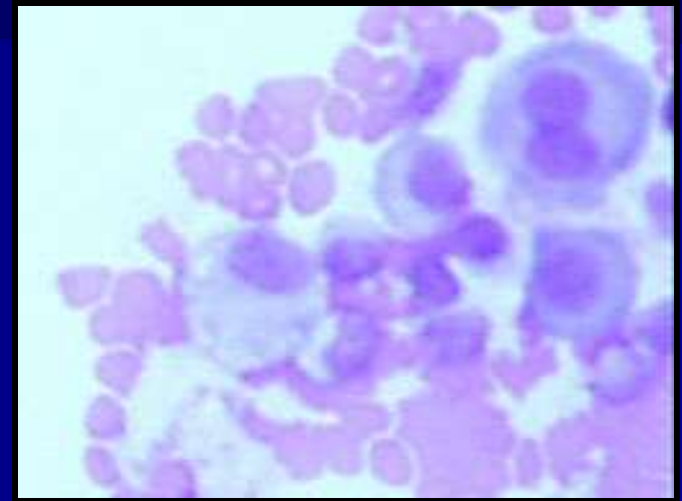
# CELLULES MESOTHELIALES

- Noyaux:
  - Rond/ovale
  - Central/paracentral
  - $N/C=0.5$
  - Nucléole
  - Multinucléation
- Cytoplasme
  - Rond, basophile
  - Limite cytoplasmique irrégulière
    - Couronne microvacuolisée
  - Pigments : lipofuschine, hémossidérine



# CELLULES MESOTHELIALES REACTIONELLES

- amas
- Polymorphisme++
- Nx excentré
- Densification de la chromatine
- Nucléole proéminent
- Augmentation de la basophilie cytoplasmique
- Dégénérescence vacuolaire : aspect « bague en chaton »



# LIQUIDES NEOPLASIQUES

Cellularité variable

Amas tridimensionnels, Papilles,  
acini, cellules isolées

Chevauchement nucléaire

Augmentation N/C

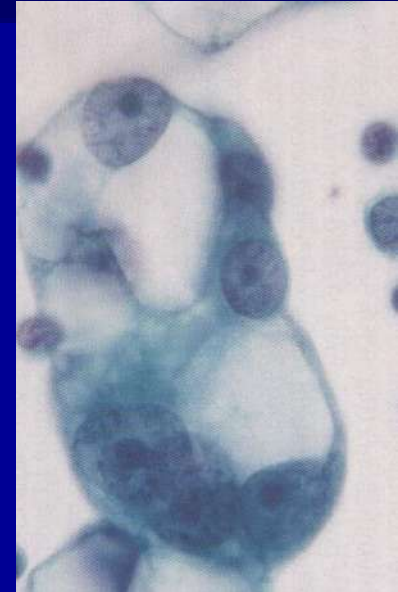
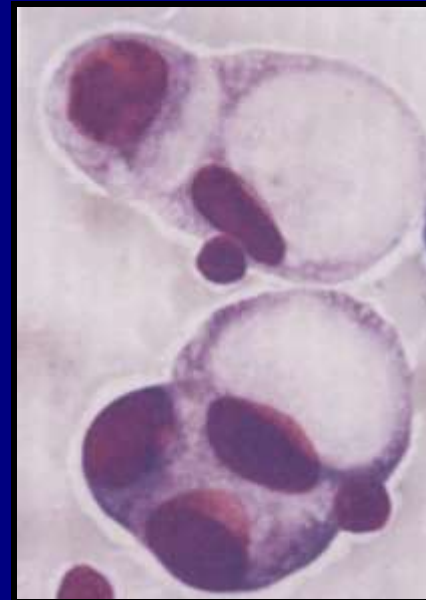
Anisocytose

Atypies nucléaires,

Hyperchromatisme, Membrane  
nucléaire épaisse, Irrégularités  
des contours, chromatine  
irrégulière, Volumineux nucléoles

# ADENOCARCINOME

- Volumineux amas
- Nucléole++,  
noyau excentré
- Vacuoles  
cytoplasmiques
- Bleu alcian+



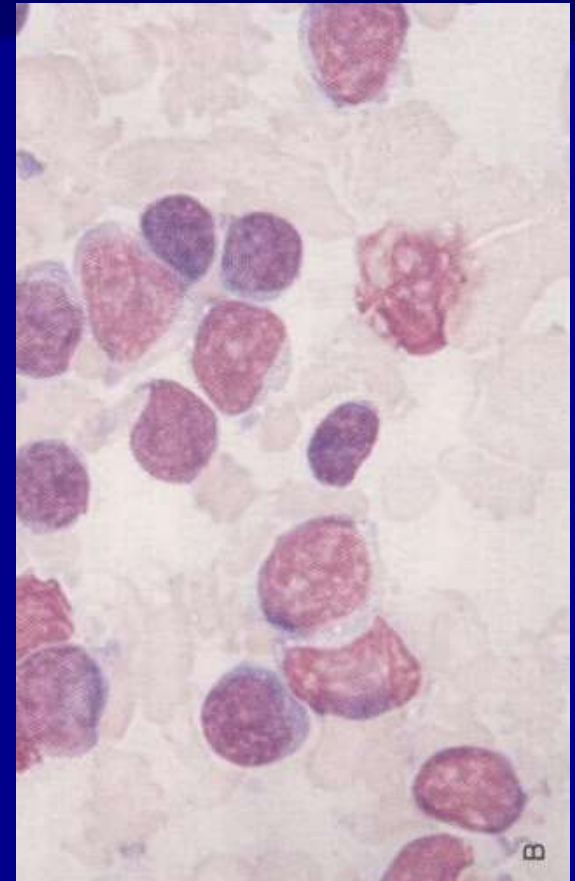
# CARCINOME A PETITE CELLULES

- ++poumon
- Isolées
- ++ pile d'assiettes
- Fragilité nucléaire
- Cellules de taille petite ou moyenne ( 2à3 L@)
- N/C élevé, noyaux nux
- Nucléoles mal visibles



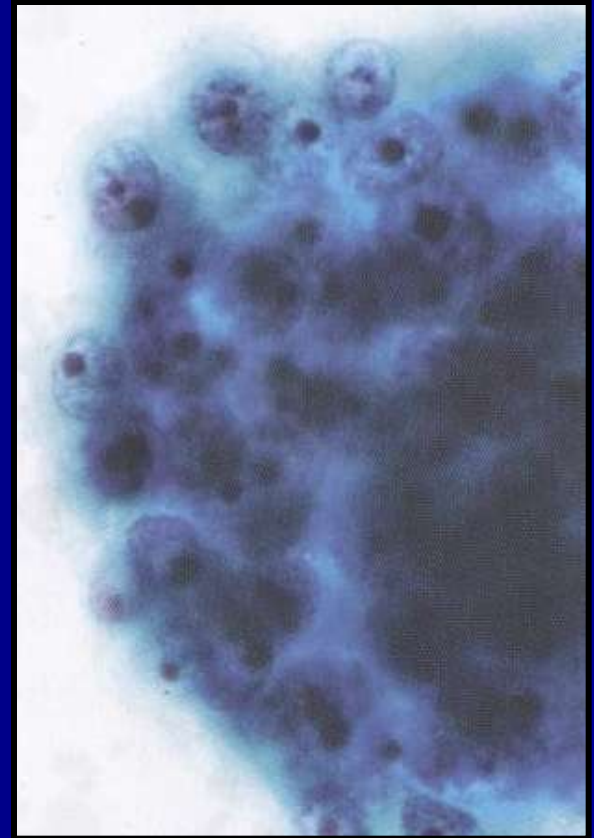
# LYMPHOME

- Cellules isolées non cohésives
- Monomorphe
- N/C élevé
- Irrégularité nucléaire



# MESOTHELIOME

- Liquide hypercellulaire
- Amas papillaires, muriformes
- Cellules isolées
- Cellules mésothéliales réactionnelles caricaturales
- N/C bas



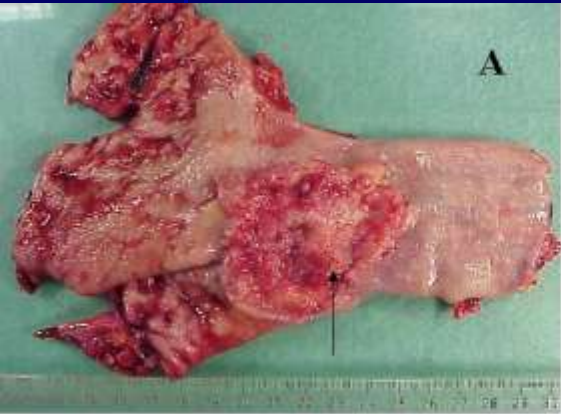
# Les tissus

- Types de prélèvements
  - Biopsies
  - Biopsie exérèse
  - Pièce opératoire

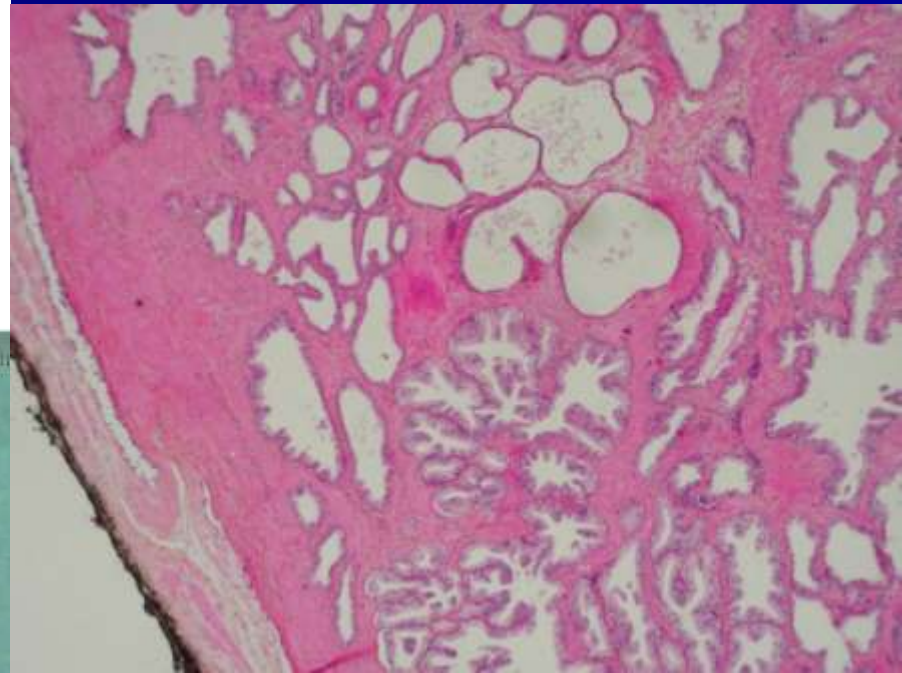
# Techniques d'étude des prélèvements tissulaires

- Etude macroscopique :
  - 1<sup>e</sup> étape indispensable pour les pièces opératoires
  - La pièce est examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée

# Piece d'oesogastrectomie pour cancer



Il peut être utile d'encrer les berges de la pièce opératoire pour mieux évaluer les limites



- L'examen macroscopique permet :
  - De donner des indications sur le pronostic
  - De sélectionner les territoires qui seront étudiés au microscope :
    - Lésion
    - Tissu sain
    - limites

# Techniques d'étude des prélèvements tissulaires

## ■ Fixation :

- indispensable pour conserver la morphologie cellulaire
- **Toute fixation défectueuse rend l'examen anatomo-pathologique impossible**
- Doit être faite le plus rapidement possible
- Par le pathologiste si labo à proximité (<1h)
- Par le préleveur +++

- Précautions à respecter pour la fixation :

- Volume de fixateur suffisant : 10 fois le volume du prélèvement
- Récipient de taille suffisante pour éviter les déformations
- Ouvrir les organes creux, trancher les organes pleins pour faire pénétrer le fixateur

# Types de fixateurs

- Formol tamponné à 10% +++++
- *Liquide de bouin*
- *Fixateurs alcooliques, en cours de développement*
- *Paraformaldehyde*
- *Glutaraldehyde*

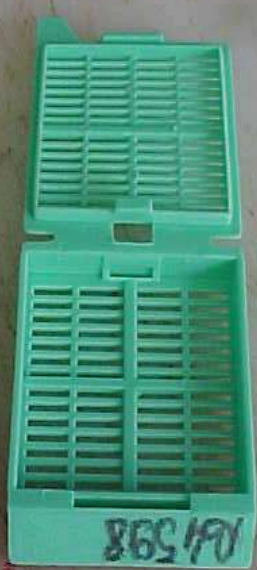
# FORMOL

- La durée de la fixation dépendant de la taille du prélèvement :
  - 1 H pour un culot cellulaire
  - 5-12 H pour une petite biopsie
  - >24 H pour une pièce opératoire
- Induit des pathologies professionnelles : Allergie, Cancer → développement de substituts

# La suite de la technique

- Faire un bloc de paraffine
- Faire une coupe
- Colorer les coupes

- Imprégnation et inclusion en paraffine
  - Prélèvements placés dans des cassettes en plastique
  - Déshydratation par des bains successifs d'alcool
  - Solvants (toluène, xylène) pour éliminer l'alcool
  - Imprégnation des tissus dans de la paraffine chaude, puis refroidissement



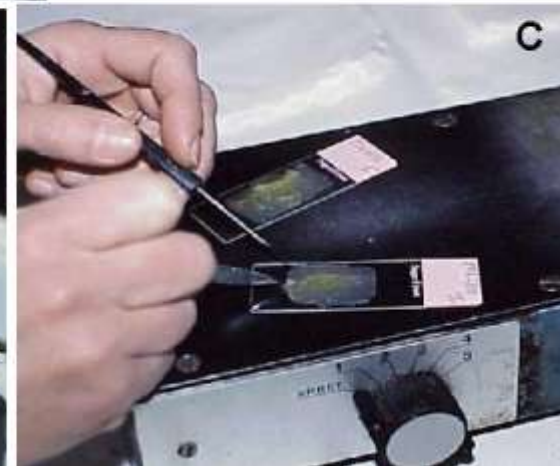
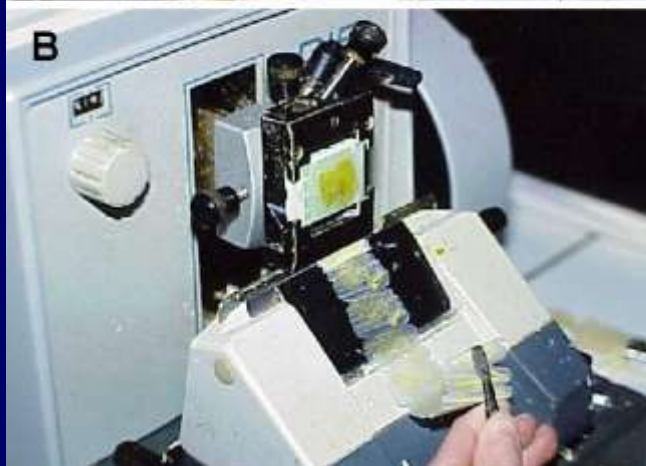
# TECHNIQUES

- L 'INCLUSION ABOUTIT AU BLOC EN PARAFFINE, MATERIEL A PARTIR DUQUEL S 'EFFECTUE
  - LA COUPE
  - LES COLORATIONS DE ROUTINES
  - LES TECHNIQUES SPECIALES

# COUPE

- Effectuée au *microtome*
- Avance réglable : coupes tissulaires de 3 à 8  $\mu\text{m}$  d'épaisseur

# COUPE

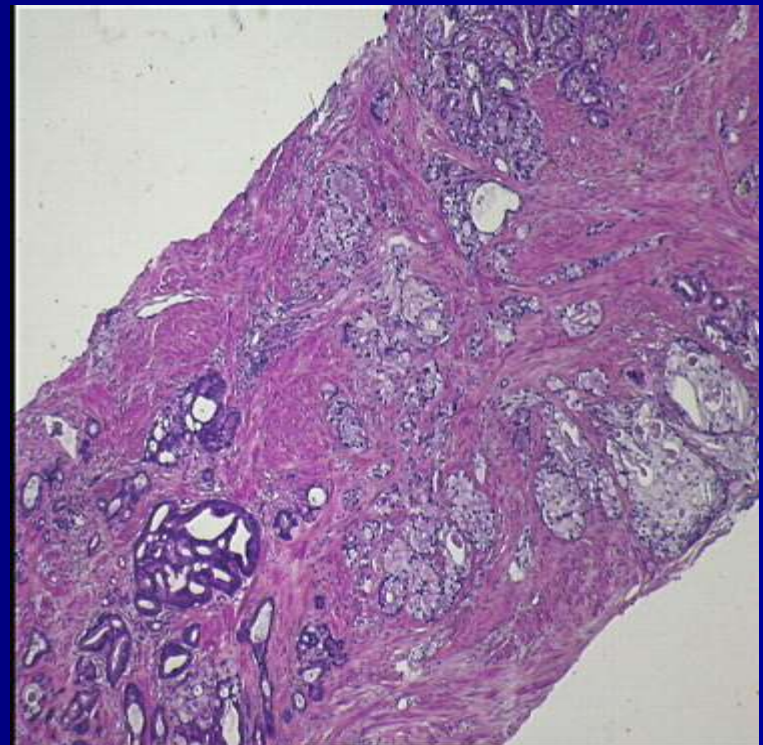


# COLORATION



# COLORATION STANDARD

- Hématoxyline Eosine Safran
  - Hématoxyline : coloration des noyaux
  - Eosine : coloration des cytoplasmes en rose
  - Safran : coloration du collagène en orange



# Montage

- Montage entre lame et lamelle nécessaire à l'examen au microscope.
  - lamelle de verre
  - film plastique collé au baume.

# Montage (manuel) des lames

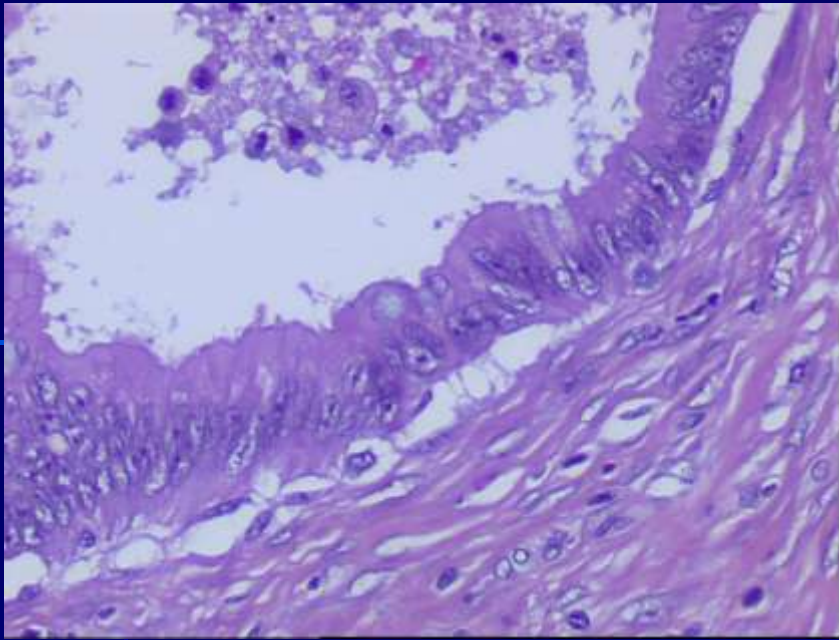


1. Déposer une goutte de milieu de montage sur les lamelles (1)
2. Appliquer la lamelle sur la lame (2)
3. Poser l'étiquette identifiant la coupe (3)

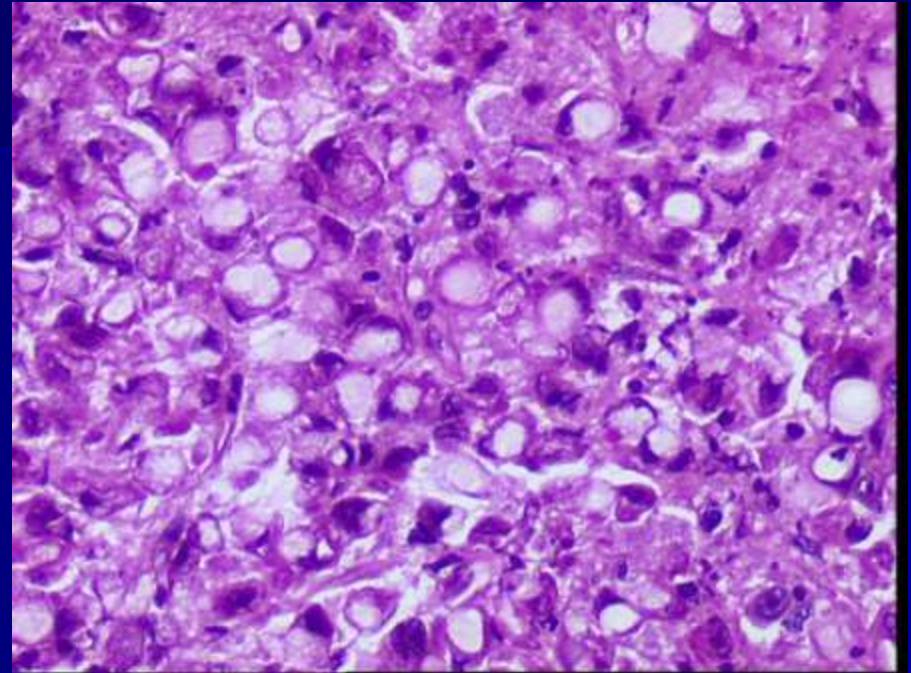
# Montage (automatique) des lames



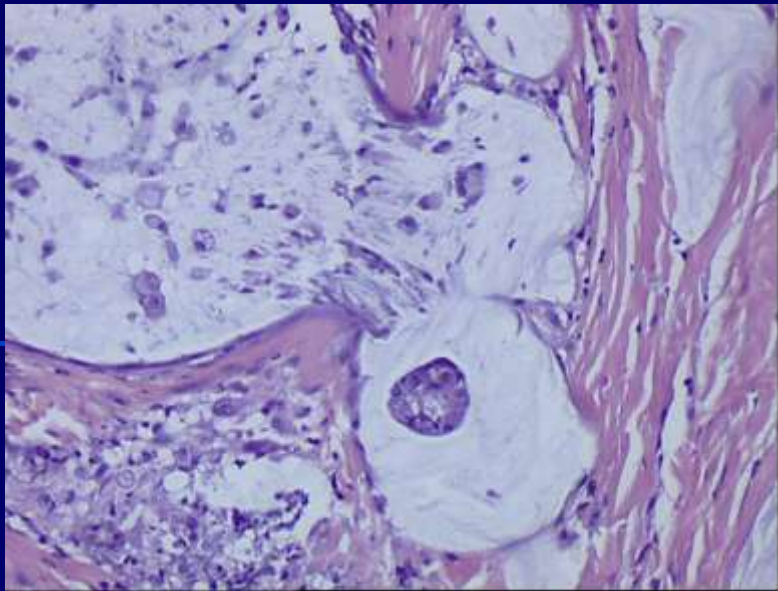
**Pour le montage de très grandes séries, il peut être intéressant d'utiliser un automate**



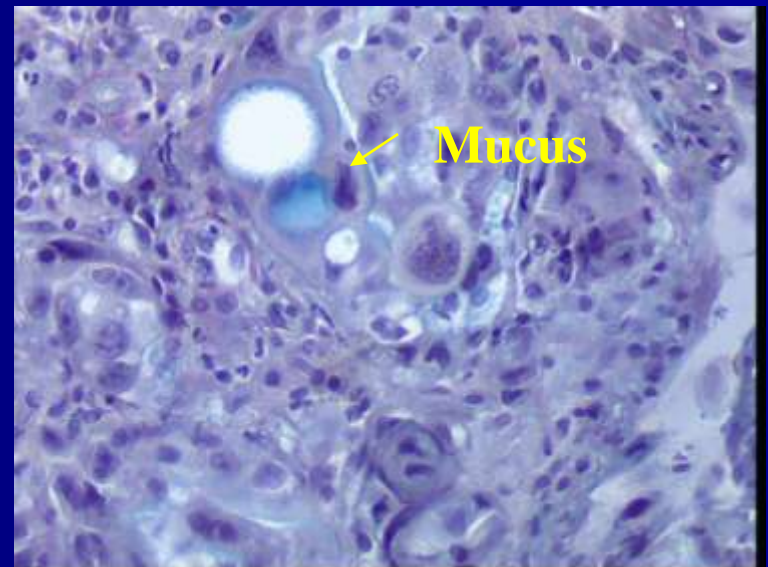
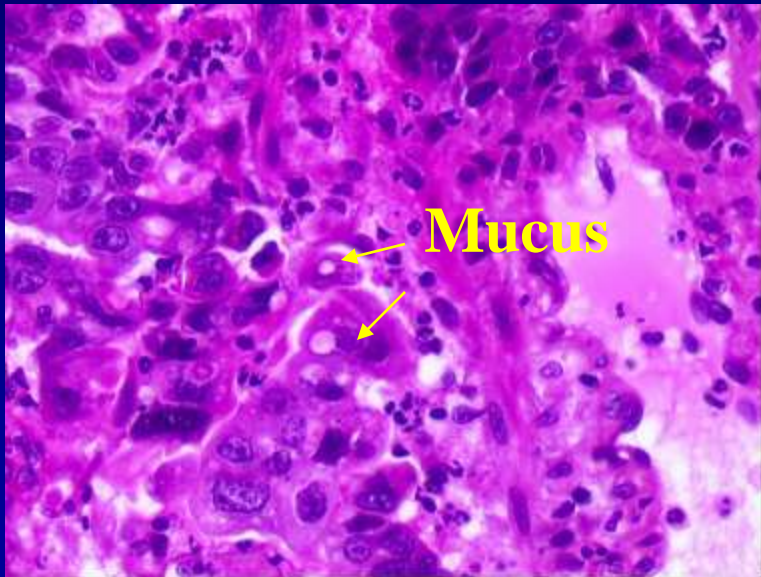
**ADK lieberkhunien**



**Cellules en bague à chaton**



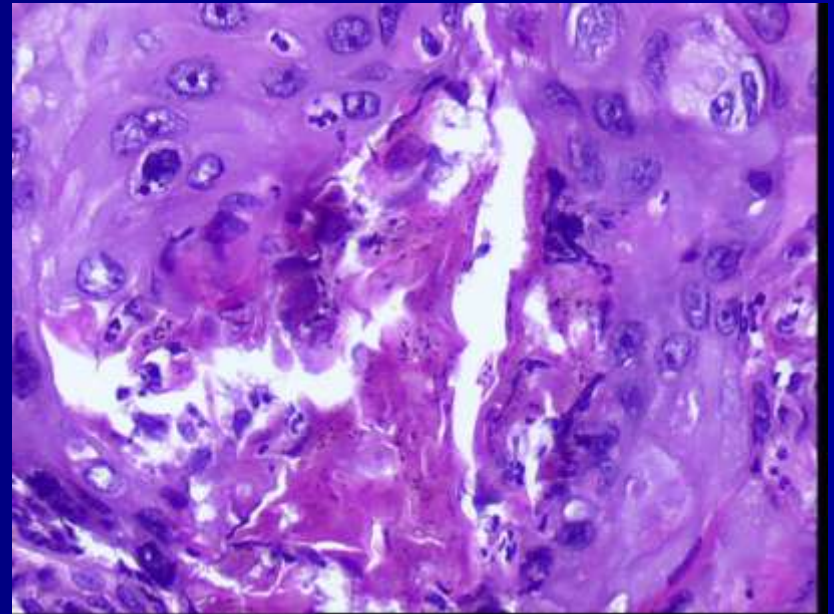
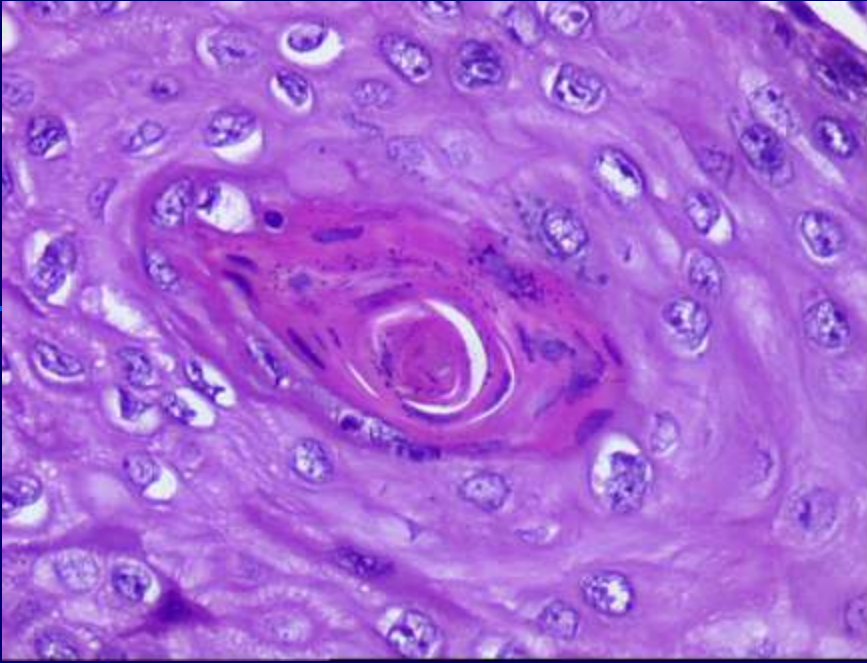
**Adénocarcinome colloïde**



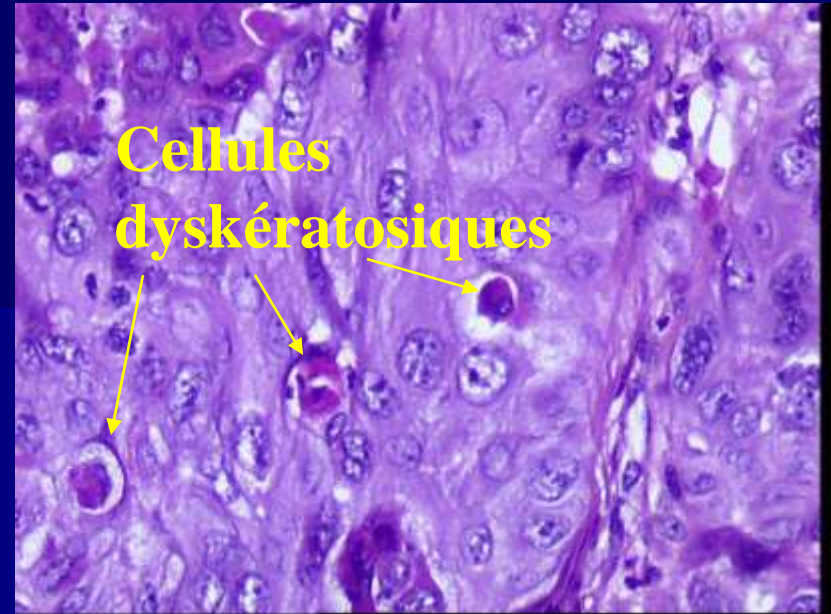
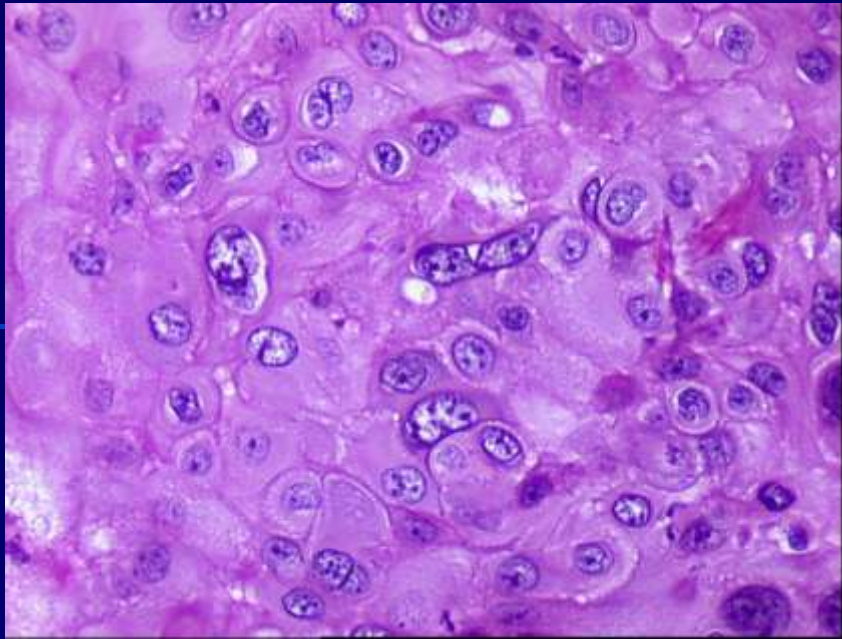
**Bleu Alcian**

**Adénocarcinome peu différencié**

**HES**



**Carcinome malpighien**  
**kératinisation**



# Carcinome malpighien



# CONCLUSIONS

- La qualité des techniques de laboratoire est dépendante de la prise en charge initiale du prélèvement
- Une erreur au stade initial compromet le diagnostic
- Le diagnostic repose sur une confrontation des éléments cliniques, paracliniques et histopathologiques

**Fin 1<sup>er</sup> cours**

Début 2<sup>nd</sup> cours 😊

# Techniques especiales

- Examen extemporané
- Histochemie
- Immunohistochemie
- Histoenzymologie
- hybridation in situ
- Techniques spéciales liées au tissu

# Extemporané

- technique rapide de moins de 30 minutes permettant d'obtenir des préparations microscopiques analysables pendant le temps opératoire
- Indiquée pour guider le geste chirurgical

# Extemporané

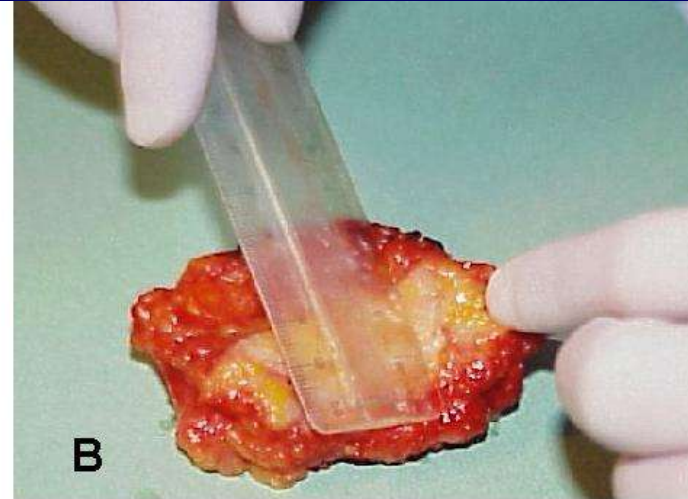
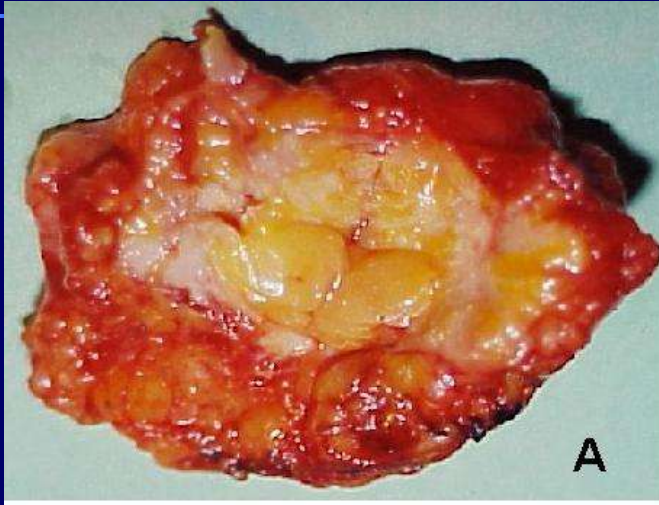
- **Objectifs :**

- détermination de la nature de la lésion abordée chirurgicalement
- évaluation des limites d'exérèse
- évaluation de l'extension d'une tumeur : métastases ganglionnaires , hépatiques...

- **étude macroscopique + + +**

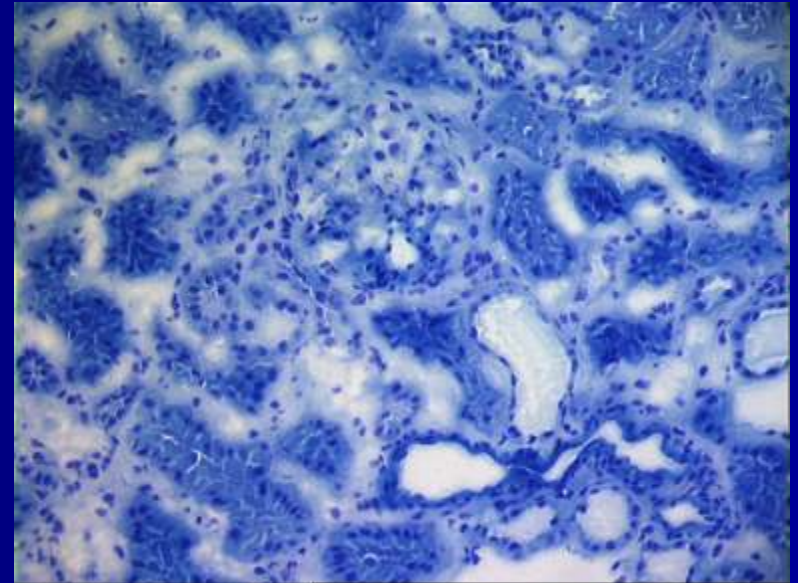
- **2 techniques : coupe congelée (++) et cytologie**

# Examen extemporané d'une tumorectomie mammaire



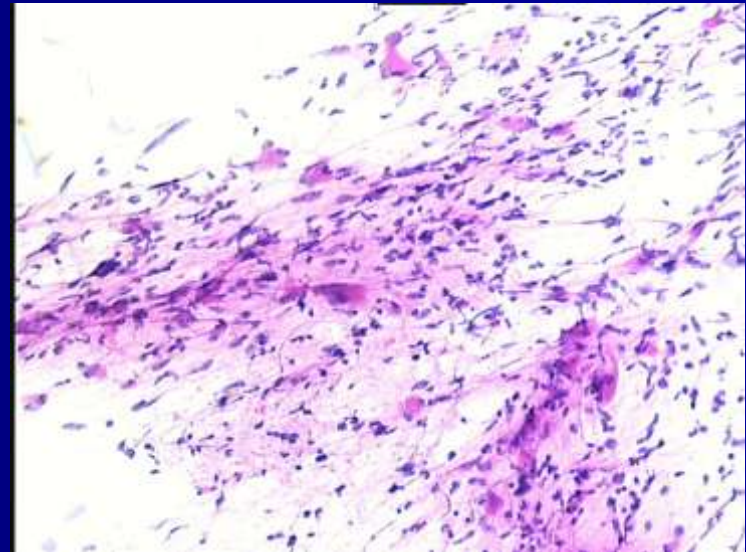
# Extemporané

- tissu frais
- Coupe à  $-20^{\circ}\text{C}$  : cryostat
- Préparations de 5 à 8  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.
- Colorant monochrome, le plus souvent bleu de toluidine.



# Extemporané

- **Cytologie :**  
apposition ou étalement tissulaire
- **Colorations :**
  - MGG rapide
  - HE



# Extemporané

- Seul un nombre réduit d'échantillons peuvent être examinés par cette technique
- Moins bonne morphologie qu'en histologie conventionnelle
- L'examen extemporané est  systématiquement contrôlé  par un examen histologique standard, le fragment analysé étant fixé après décongélation
- Le résultat est noté dans le compte rendu final

# HISTOCHIMIE

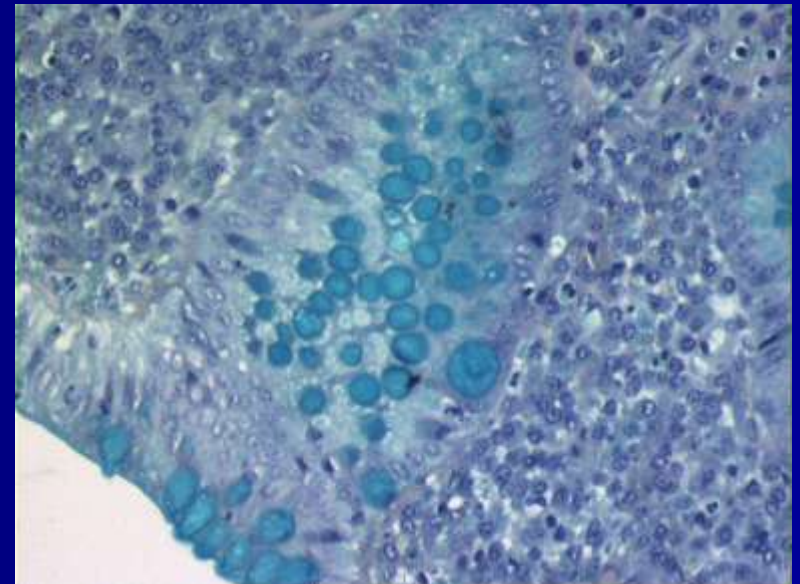
- Colorations spéciales permettant :
  - Etude des produits de sécrétion cellulaire
  - Etude de la matrice extra cellulaire et recherche de dépôts
  - Recherche de microorganismes
- Lumière blanche, polarisée ou UV

# COLORATIONS SPECIALES

- **constituant intra-cellulaire anormal ou normal en excès**

- **ex :**

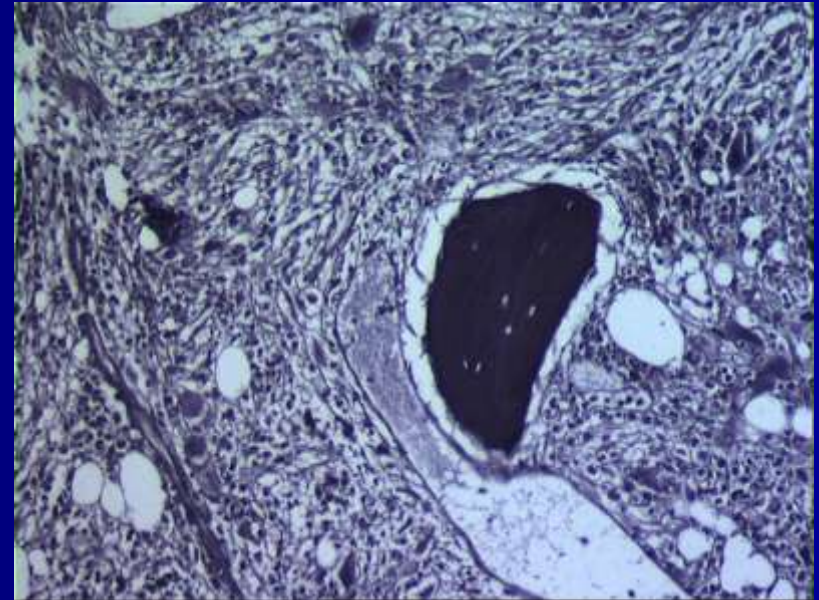
- glycogène coloré par PAS, avec réaction diastase sensible ;
- mucus, coloré par bleu alcian ou mucicarmin



*Bleu alcian : vacuoles de mucus dans la muqueuse colique*

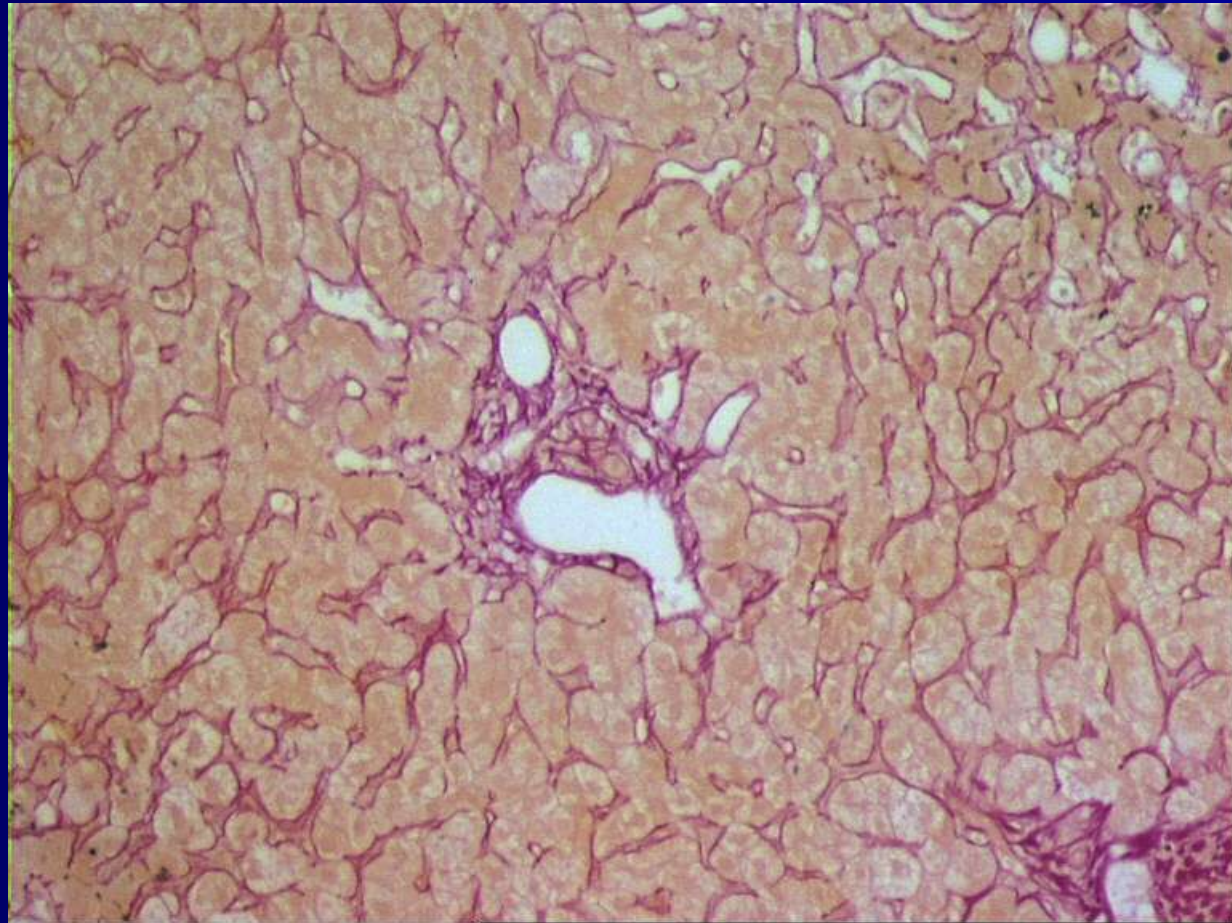
# COLORATIONS SPECIALES

- **Matrice extracellulaire**
  - MPS
  - Collagène
  - Amylose
- **Ex :** fibrose de la moëlle osseuse et réticuline

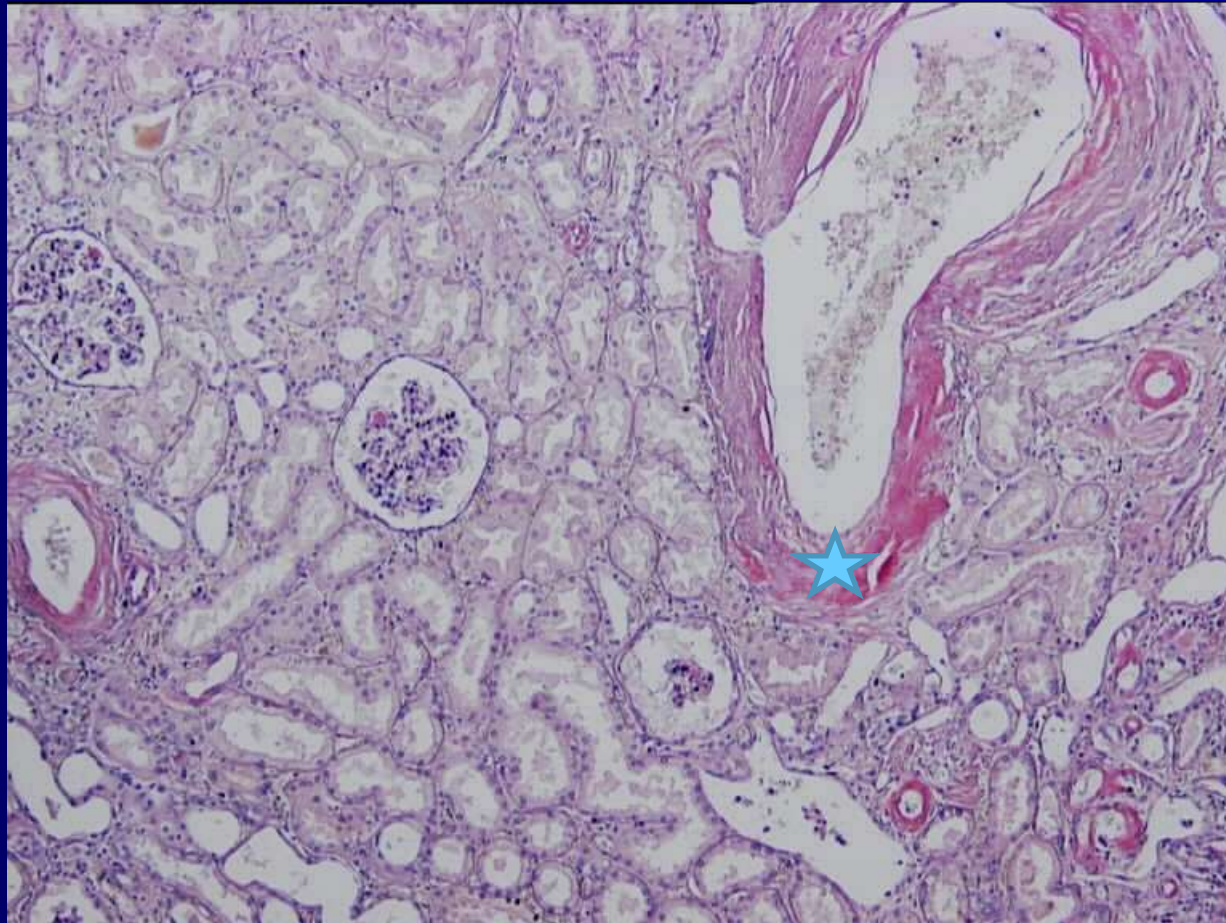


*Gordon : coloration de la réticuline en noir*

# ROUGE SIRIUS ET FIBROSE HEPATIQUE



# ROUGE CONGO / AMYLOSE

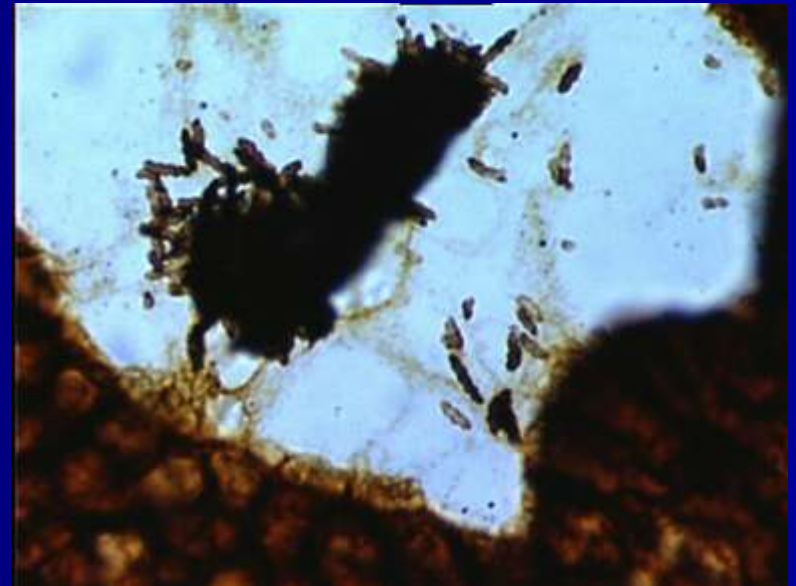


# COLORATIONS SPECIALES

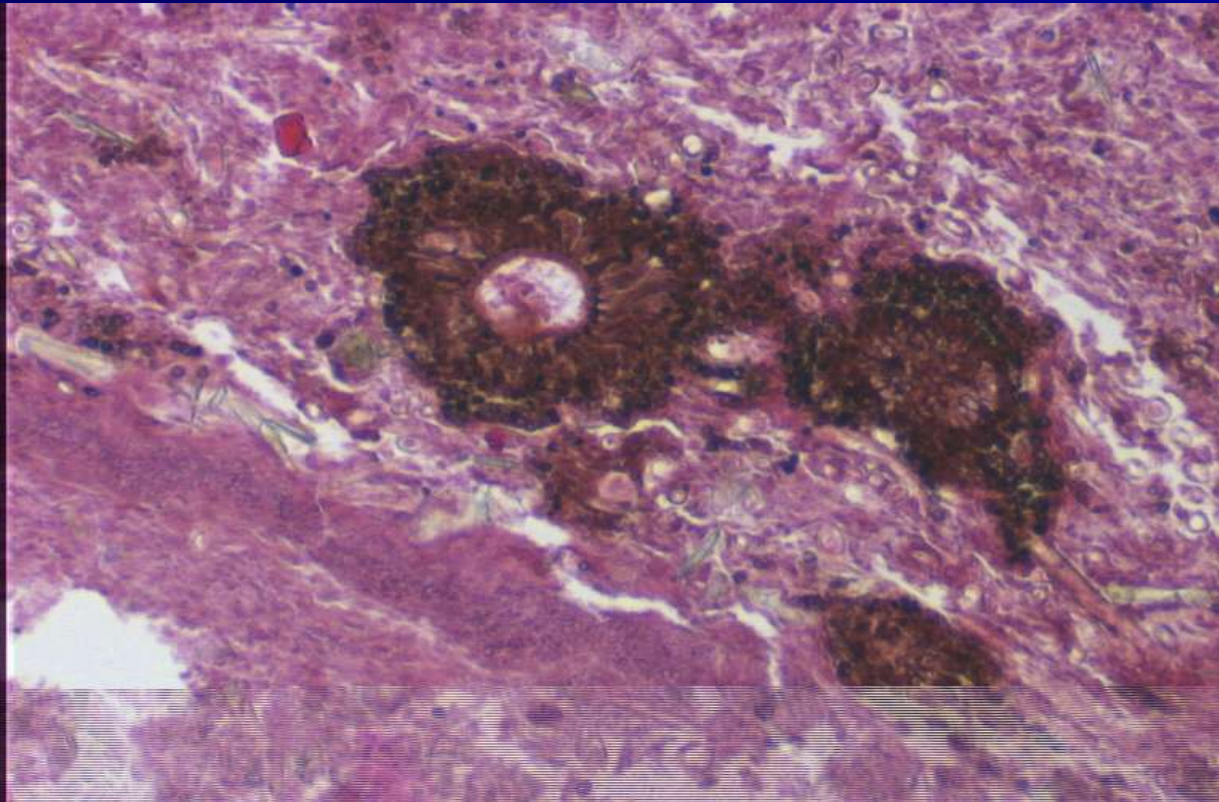
- organites intra-cytoplasmiques :
  - ex double striation des fibres musculaires lisses par hématoxyline phosphotungstique.

# COLORATIONS SPECIALES

- agents micro-biologiques
  - ex : bactéries Gram, Warthin starry -->
  - mycobactéries par coloration de Ziehl-Nielsen,
  - champignon par coloration argentique de Gomori-Grocott.



# GOMORI GROCCOTT ET CHAMPIGNONS



# Histoimmunologie

# Histoimmunologie

- Techniques permettant la mise en évidence d'antigènes tissulaires ou cellulaire, sur coupe ou sur étalement cellulaire.
- La recherche d'antigène s'effectue en utilisant des anticorps spécifiques polyclonaux ou monoclonaux produits en général chez le lapin ou la souris.

# Histoimmunologie

## ■ Immunofluorescence :

- anticorps couplé à un fluorochrome (visible en lumière UV)
- Technique directe +++

## ■ Immunohistochimie :

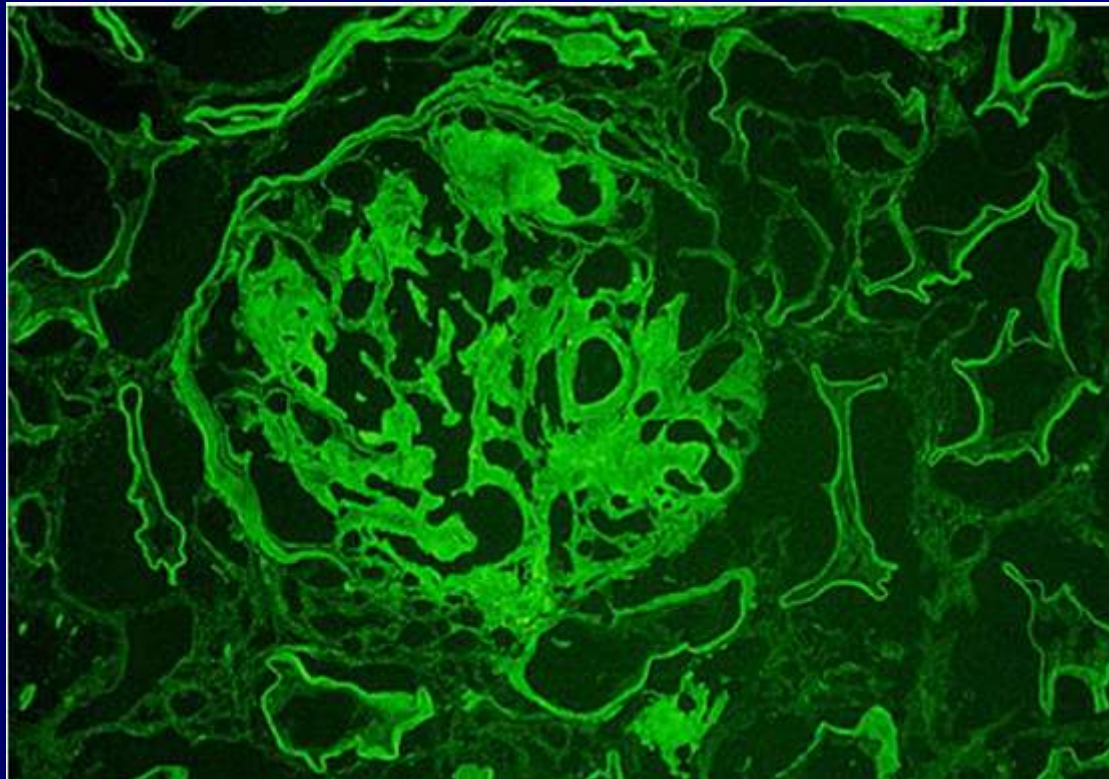
- anticorps couplé à une enzyme, sur coupe tissulaire
- Utilisation très large de l'IHC en pratique +++
- Méthode indirecte

## ■ Immunocytochimie :

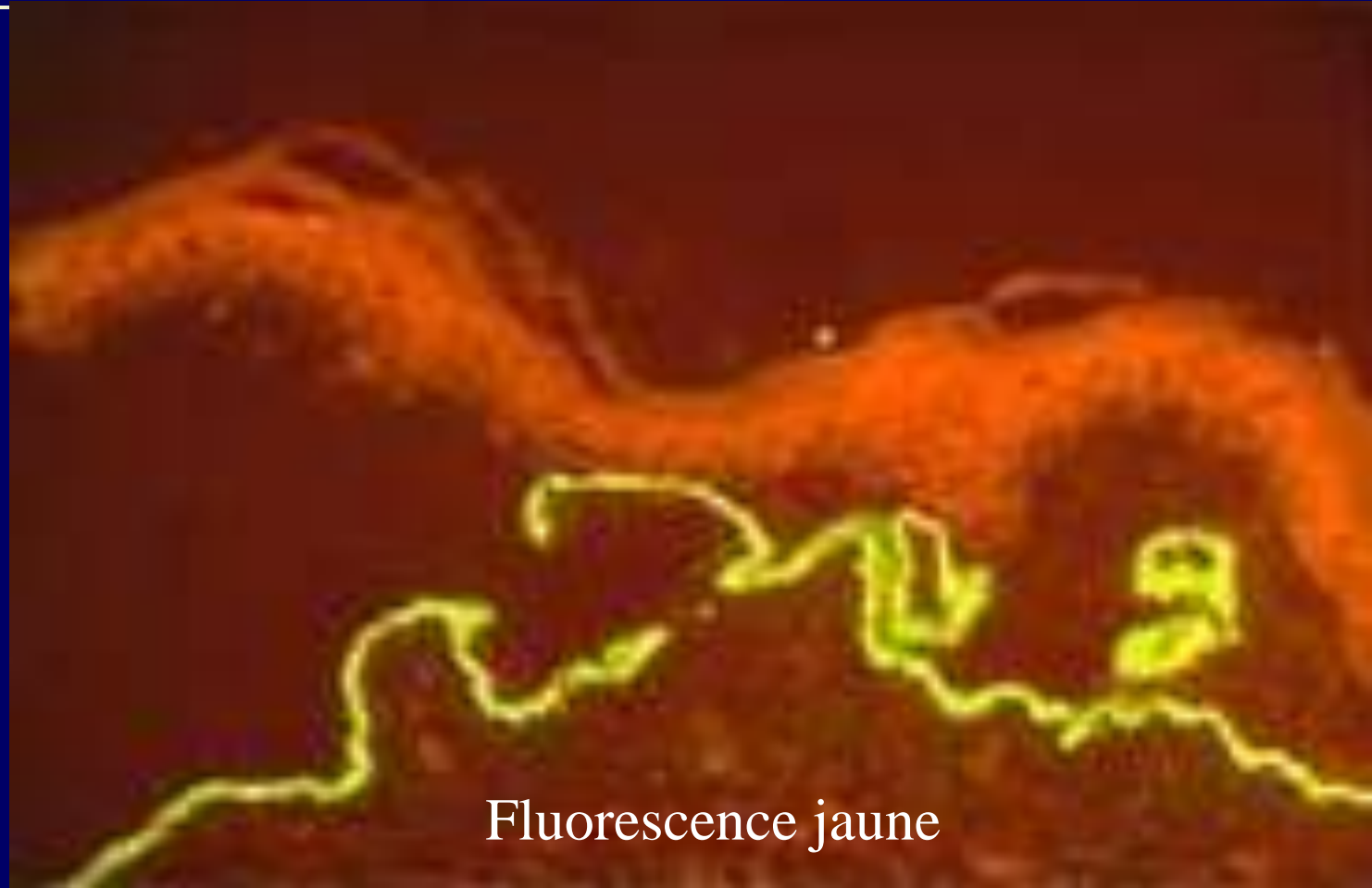
- anticorps couplé à une enzyme, sur prélèvement cytologique
- Méthode indirecte

*Pour l'immunohisto- et l'immunocyto-chimie, la coloration du marquage est due à la réaction enzymatique avec le substrat de l'enzyme, il s'observe en lumière blanche*

# Dépôts d'Ig dans un glomérule rénal (immunofluorescence)



# Dépôt linéaire de complément sur la membrane basale de l'épiderme (immunofluorescence)



# Immunohistochimie

The image shows a histological section of breast cancer tissue. The cells are stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing blue nuclei and pink cytoplasm/extracellular matrix. Overlaid on this is a brown chromogen (DAB) that highlights the cell membranes of the cancer cells, indicating a positive result for the anti-c-erbB2 antibody. The staining is localized to the cell surfaces, forming a distinct brown outline around the nuclei.

Marquage membranaire avec l'anticorps anti-c-erbB2  
dans un cancer du sein

# Histoimmunologie

- Paraffine ou congélation ?
  - Dégradation des structures antigéniques par la fixation ou par le chauffage lors de l'inclusion (58°)
  - La majorité des **antigènes extracellulaires** ( bande lupique, fraction du complément, immuns complexes, molécules d'adhésion ...) doivent être recherchés sur coupe en congélation, et nécessite la **congélation** immédiate de la biopsie en azote liquide (EX / biopsie de peau, biopsie de rein ...) → IF +++

# Histoimmunologie

- Paraffine ou congélation ?
  - Les antigènes cellulaires membranaires sont également souvent altérés par la fixation et un fragment congelé est parfois nécessaire ( ex : typage lymphocytaire).

# Histoimmunologie

- méthode

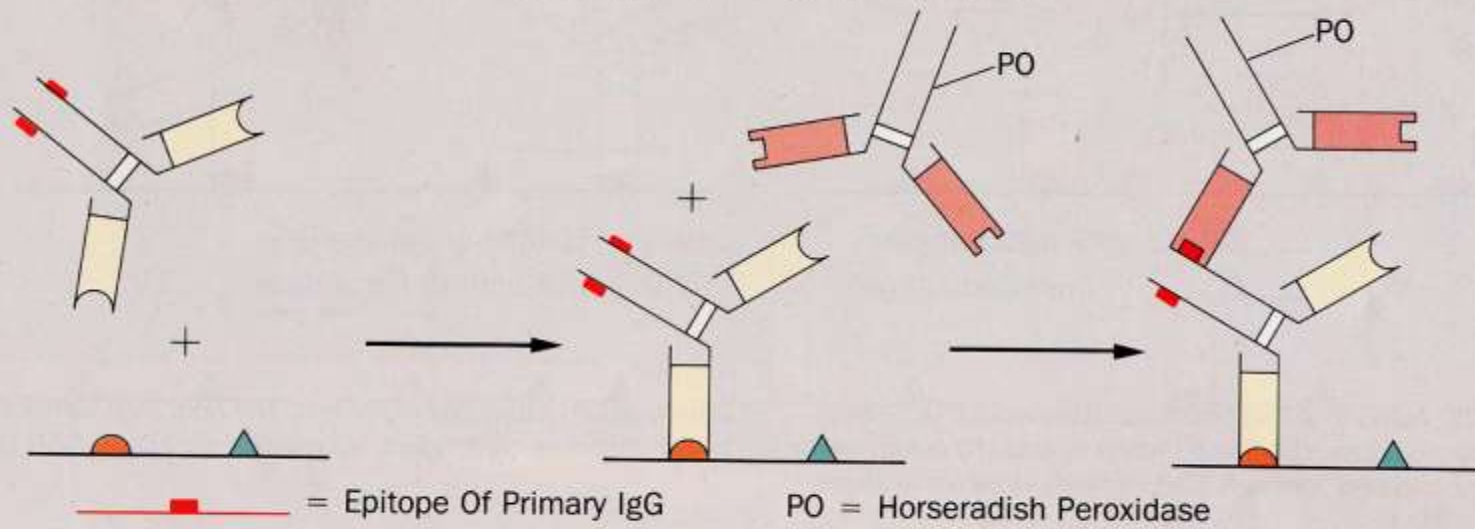
- *les techniques directes* où la molécule de chromogène souvent fluorochrome est couplée à l'anticorps (immunofluorescence).
- Lecture en lumière UV

# Histoimmunologie

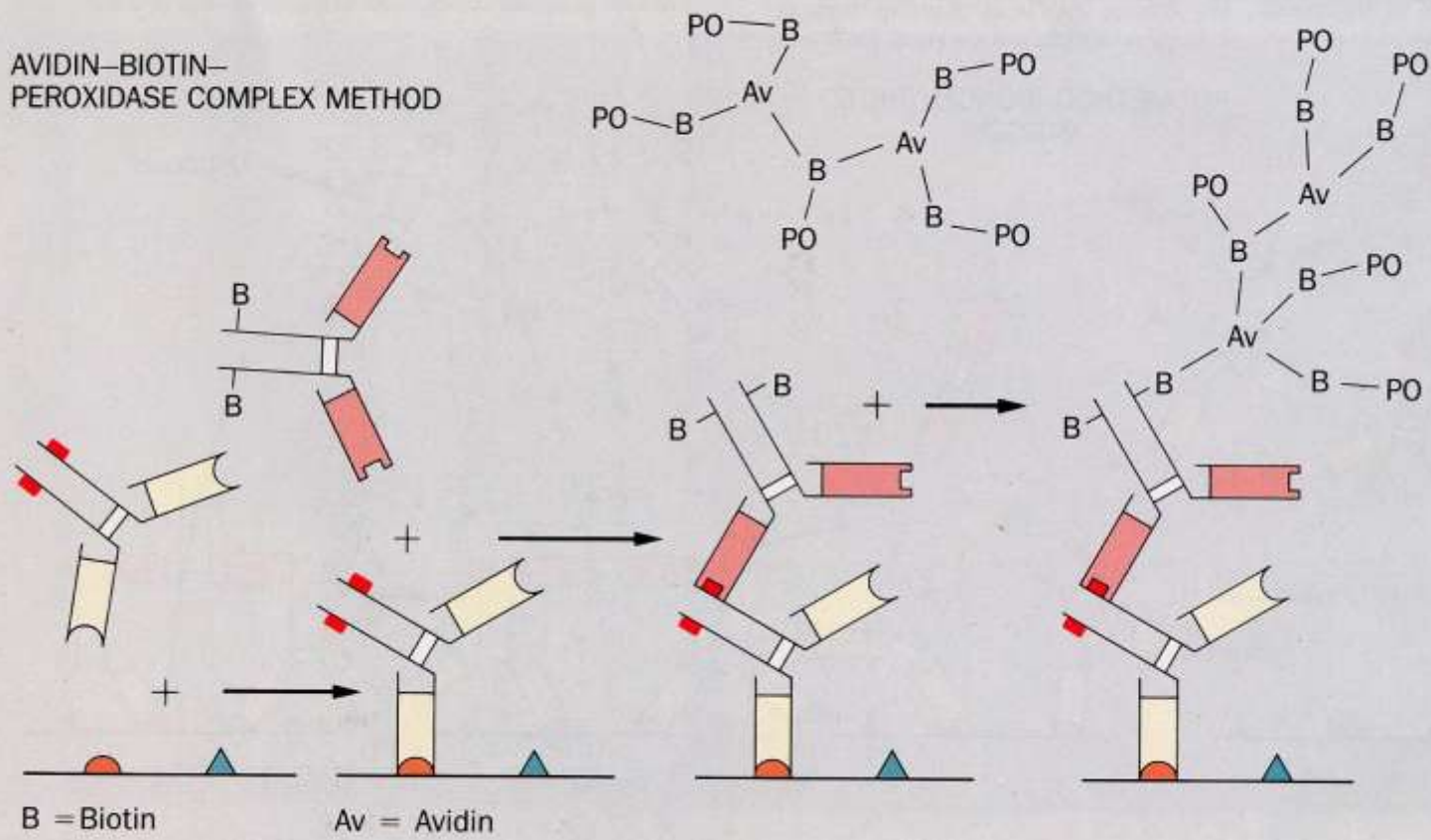
## ■ Méthode :

- les *méthodes indirectes* multicouches, en utilisant un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris, associé à un complexe de révélation portant plusieurs molécules de chromogène, permettant une amplification du signal.
- résultat à comparer avec un témoin négatif et un témoin positif.

### INDIRECT IMMUNOPEROXIDASE METHOD

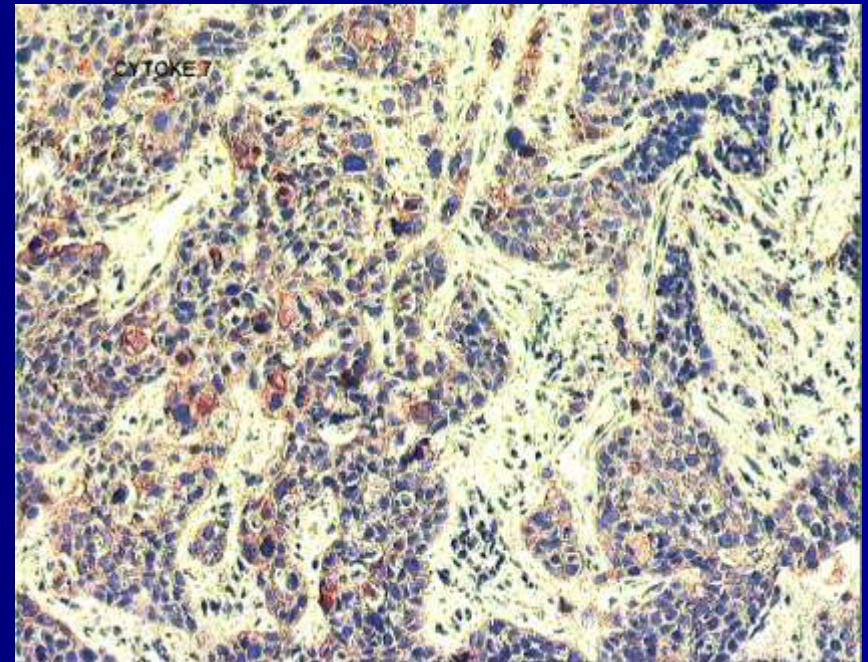


AVIDIN-BIOTIN-PEROXIDASE COMPLEX METHOD

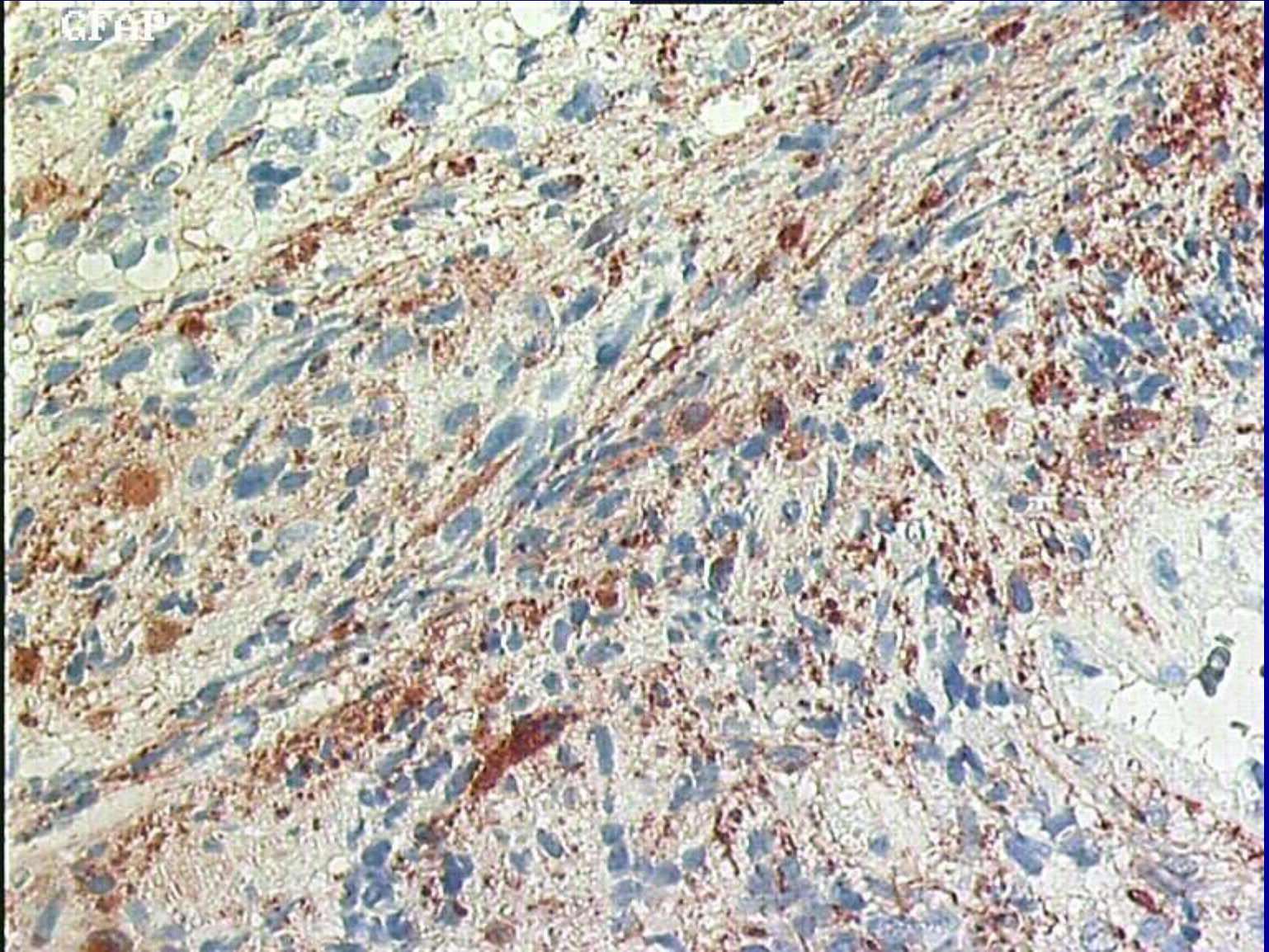


# Histoimmunologie

- Antigènes du cytosquelette :
  - filaments de cytokératine retrouvés dans les tumeurs malignes épithéliales;
  - filaments de desmines dans les tumeurs musculaires

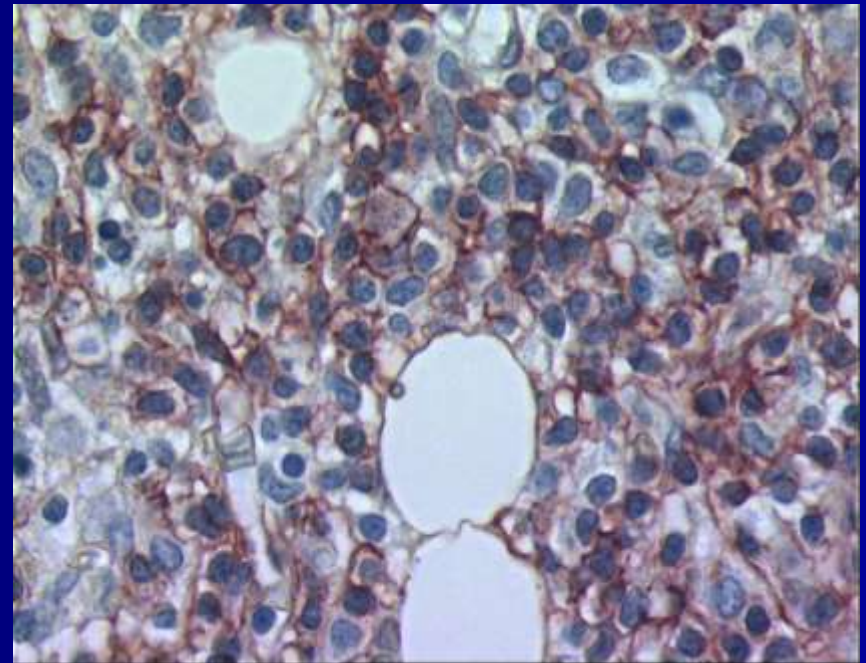


GFAP



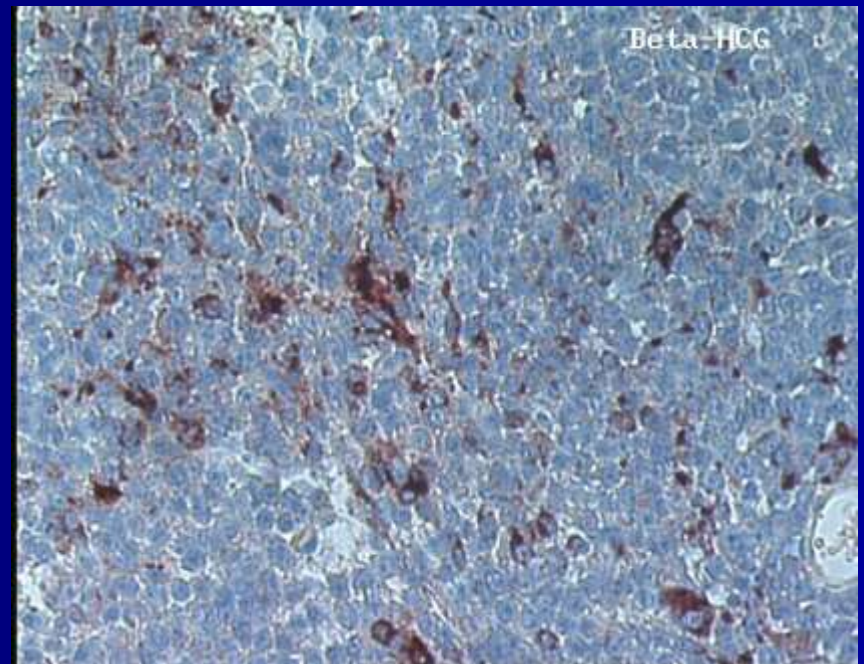
# Histoimmunologie

- Typage cellulaire par étude des antigènes membranaires :
  - lymphocytes
  - cellules épithéliales
- ex : lymphome B positif avec CD 20



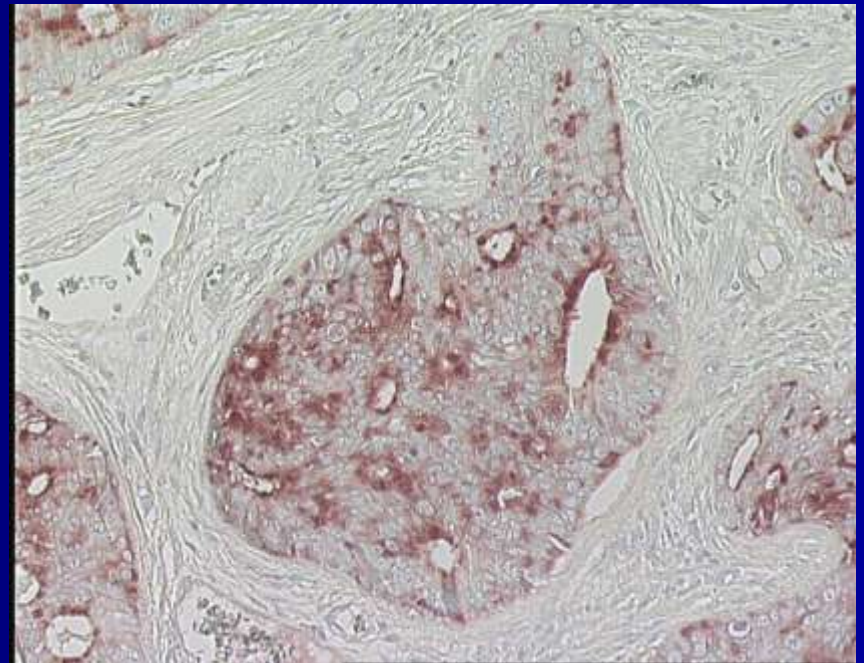
# Histoimmunologie

- Type de sécrétion cellulaire :
  - tumeurs endocrines
  - tumeurs germinales
- ex : présence d 'hCG dans une tumeur testiculaire



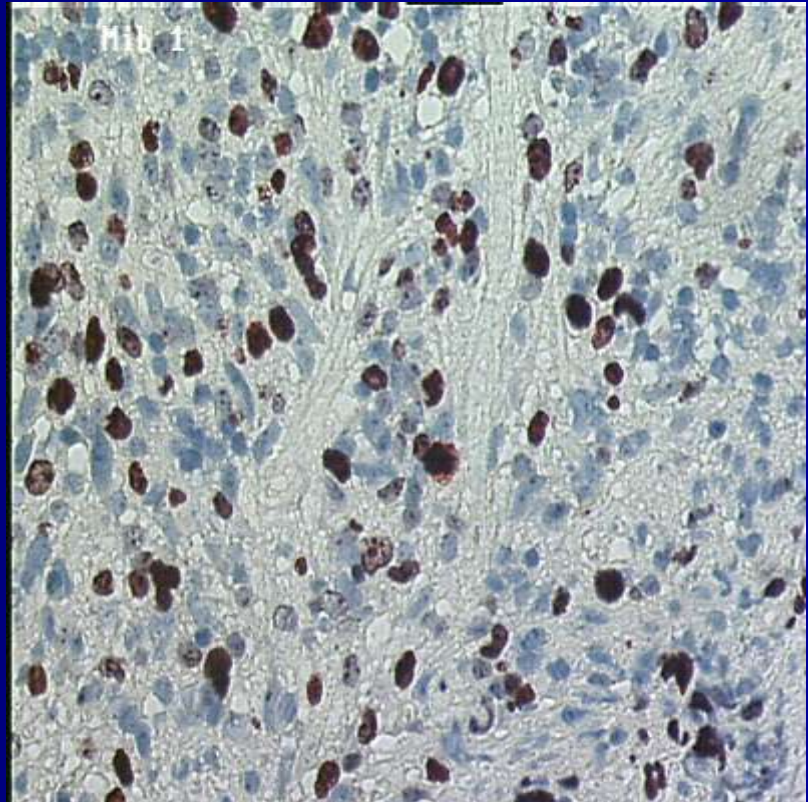
# Histoimmunologie

- Enzymes intracellulaires :
  - chromogranine
  - synaptophysine
  - phosphatases
- Ex : mise en évidence de phosphatase acide dans un Kc de prostate



# Histoimmunologie

- Protéines du cycle cellulaire et apoptose
  - Ex : Mib1 (marqueur de prolifération)
- Récepteurs hormonaux
  - Ex : RO et RP

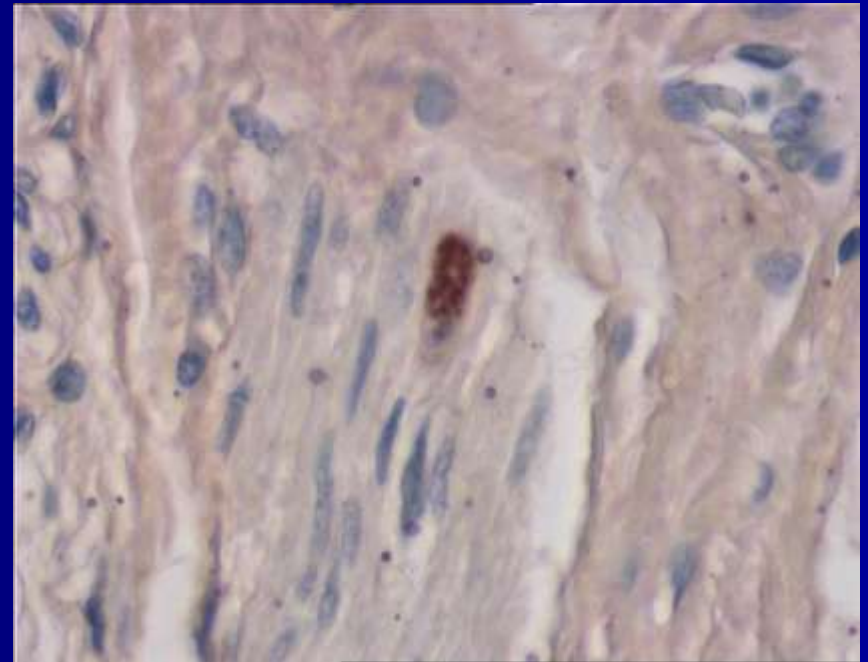


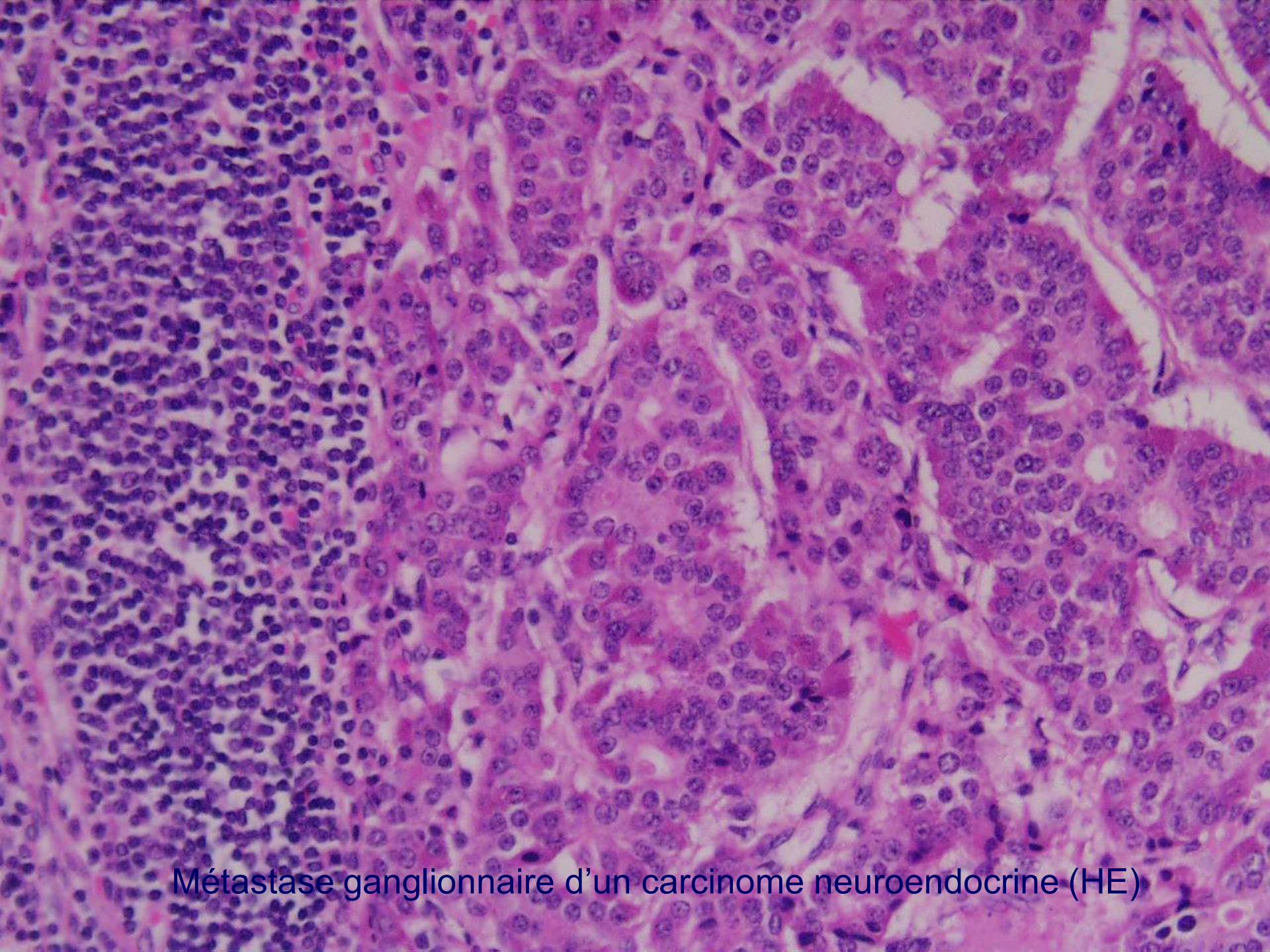
# Histoimmunologie

## ■ Agents

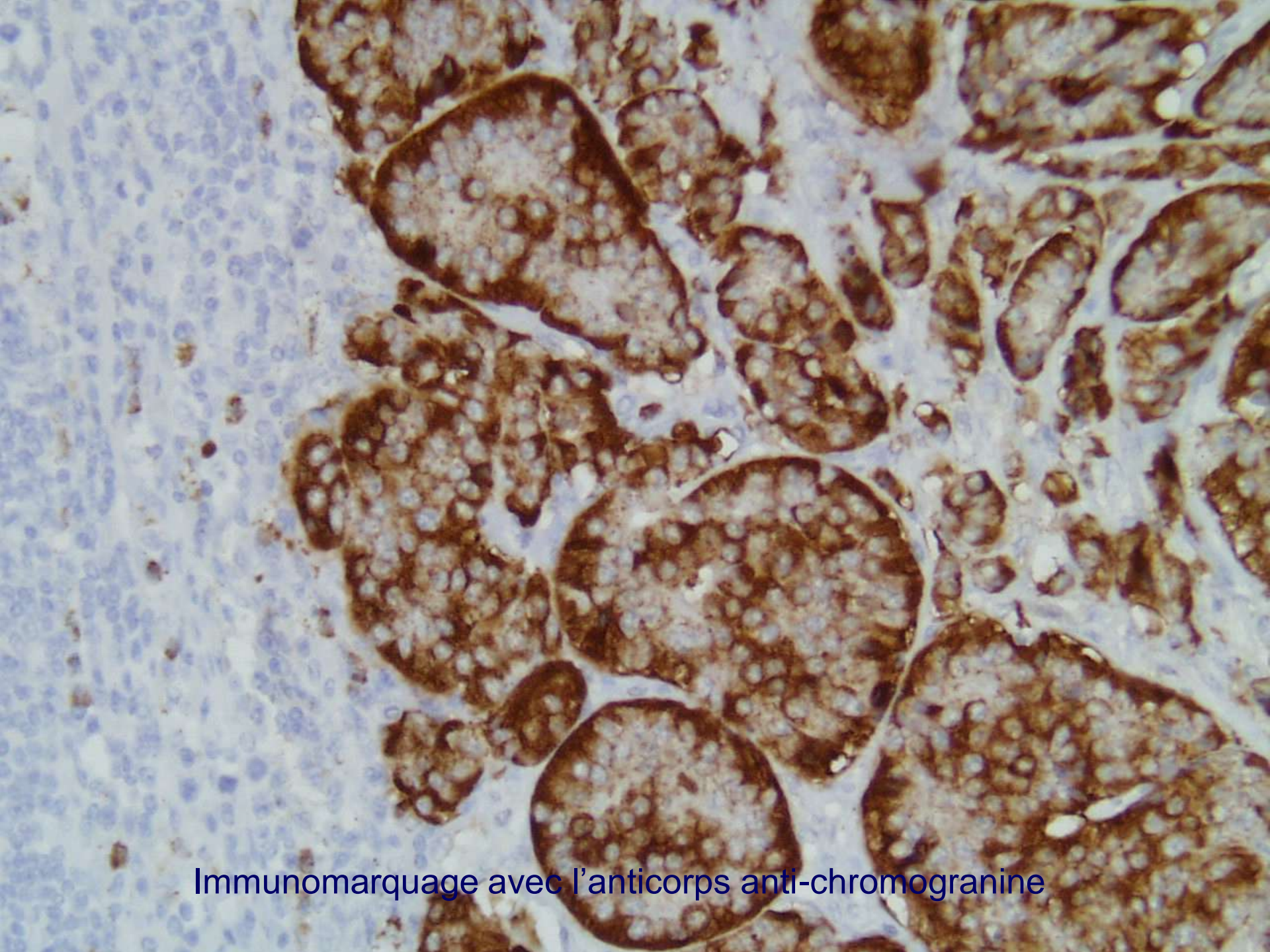
microbiologiques :

- Virus CMV, herpes, hépatite B
- Ag parasites : toxoplasmose --->, leishmaniose
- Ag fongiques : histoplasmose ...

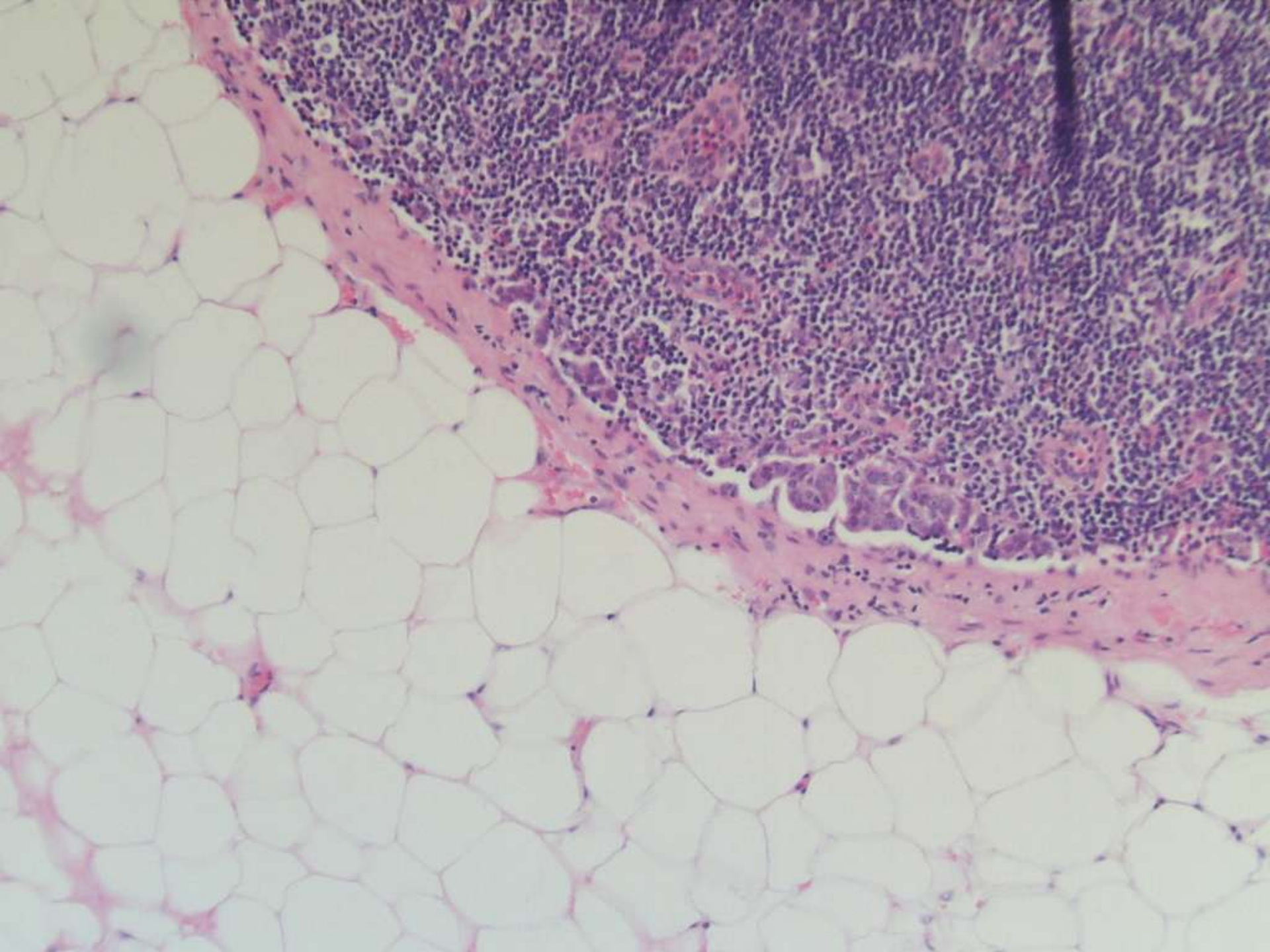


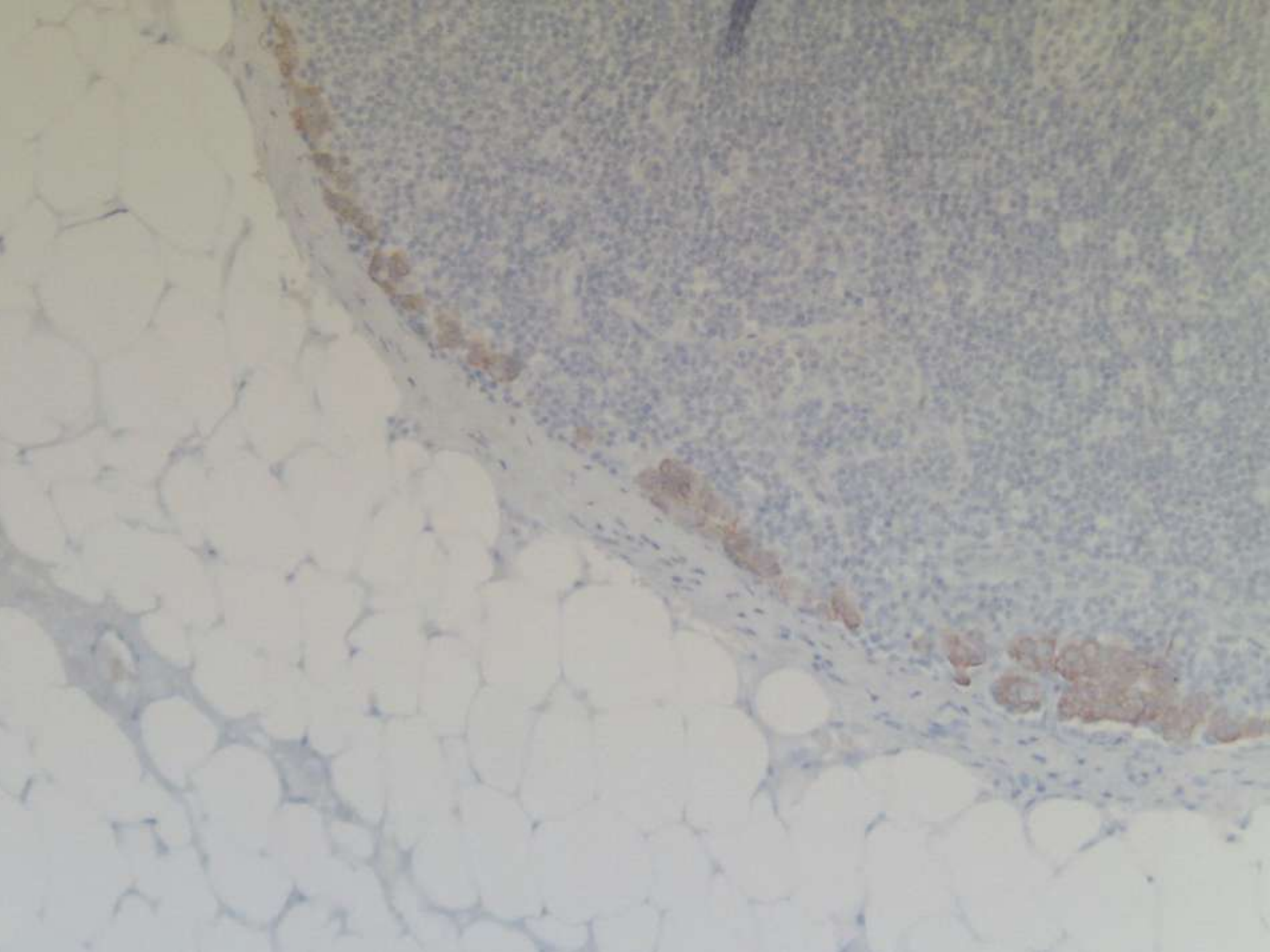


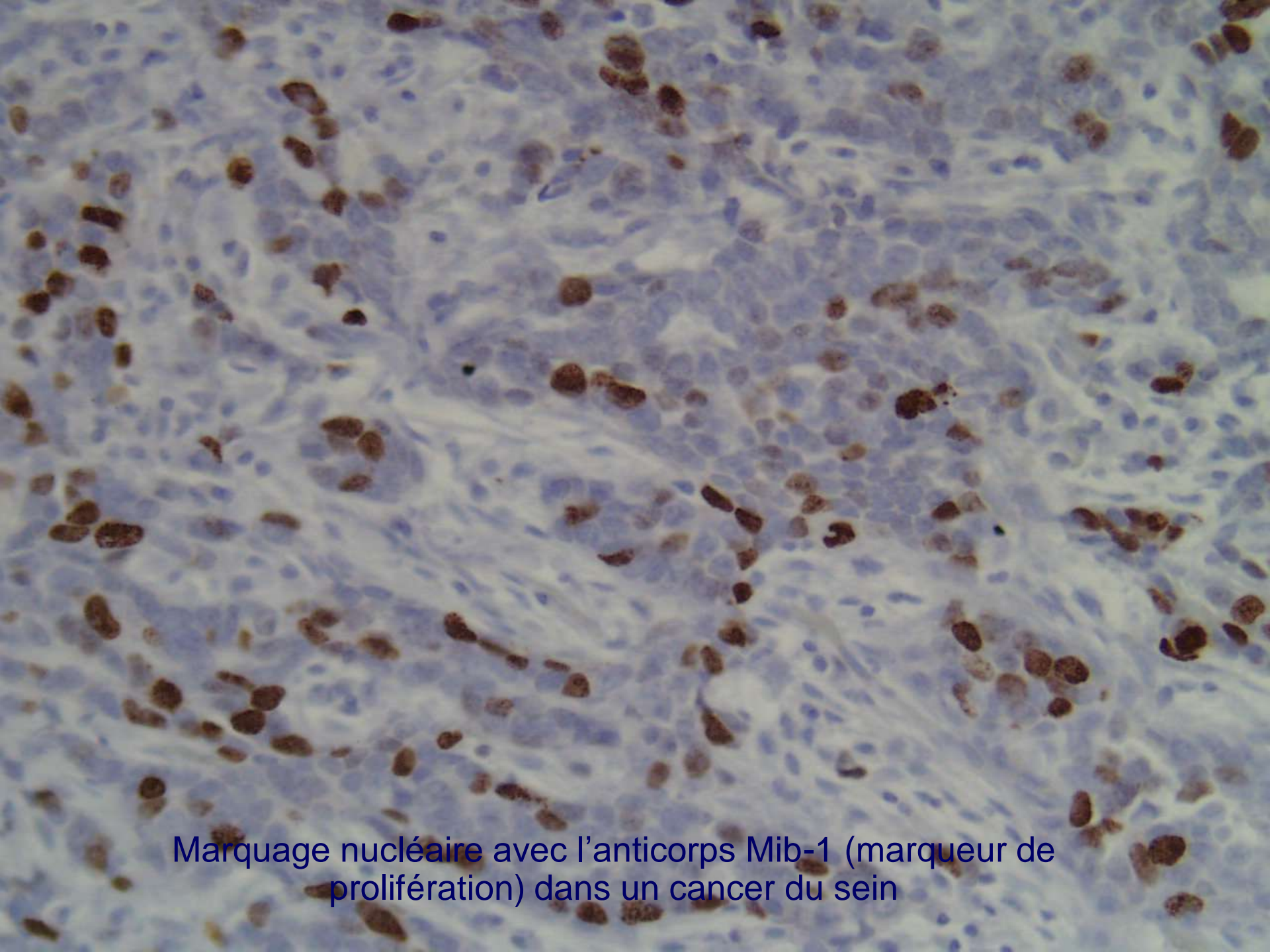
Métastase ganglionnaire d'un carcinome neuroendocrine (HE)



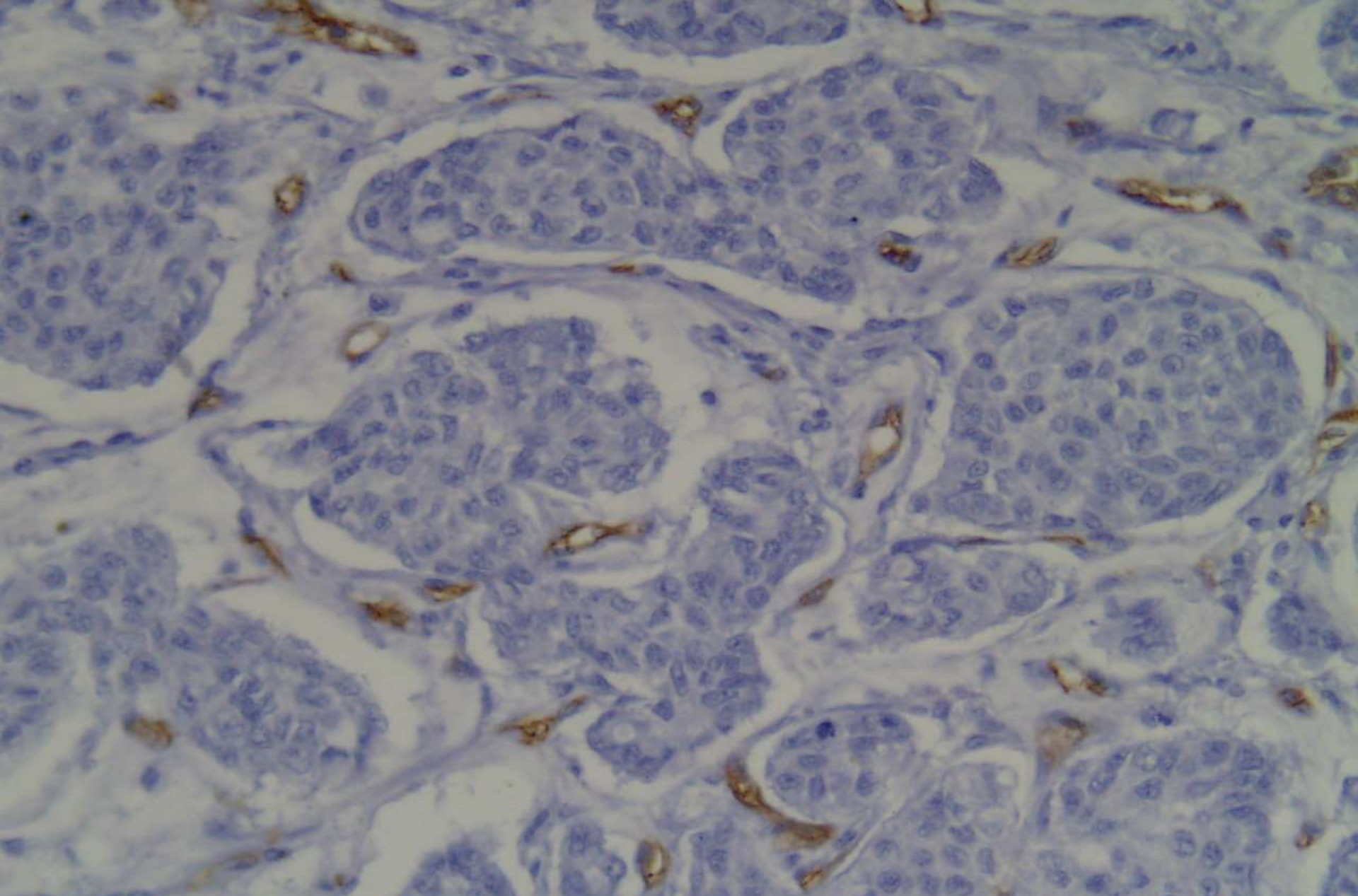
Immunomarquage avec l'anticorps anti-chromogranine







Marquage nucléaire avec l'anticorps Mib-1 (marqueur de prolifération) dans un cancer du sein



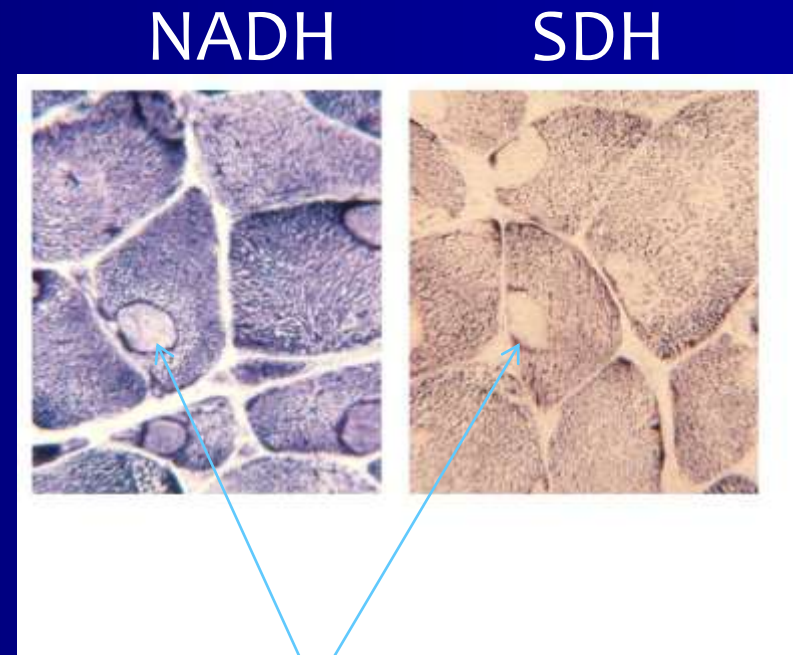
Marquage des cellules endothéliales avec l'anticorps anti-CD34 dans un cancer du sein

# **Perte d'expression de MLH1 dans un cancer colique**



# Histo-enzymologie

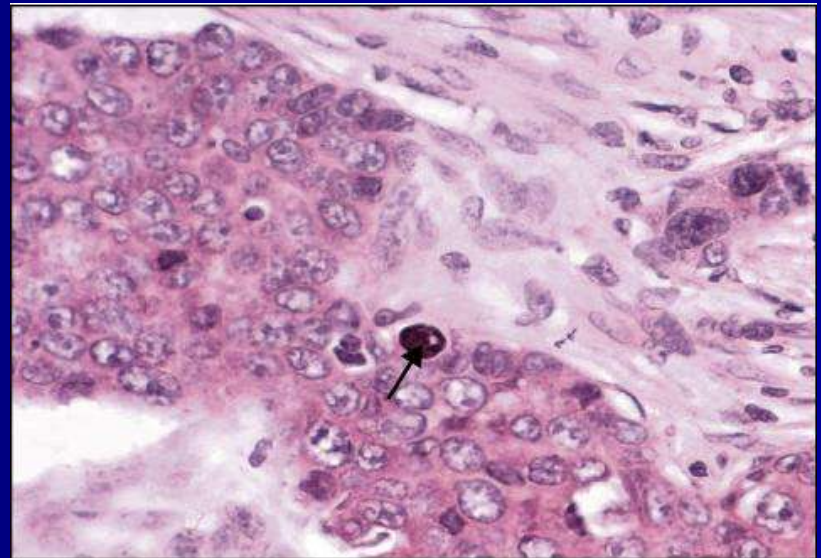
- Mise en évidence d'une activité enzymatique
- Sur coupe congelée
- Indication : étude des biopsies musculaires pour recherche de myopathie



Vacuoles dépourvues d'activité enzymatique

# Hybridation in situ

- Mise en évidence de séquence ADN ou ARN pathologique par utilisation de sondes spécifiques couplées à un chromogène
  - génome viral :  
HPV, EBV

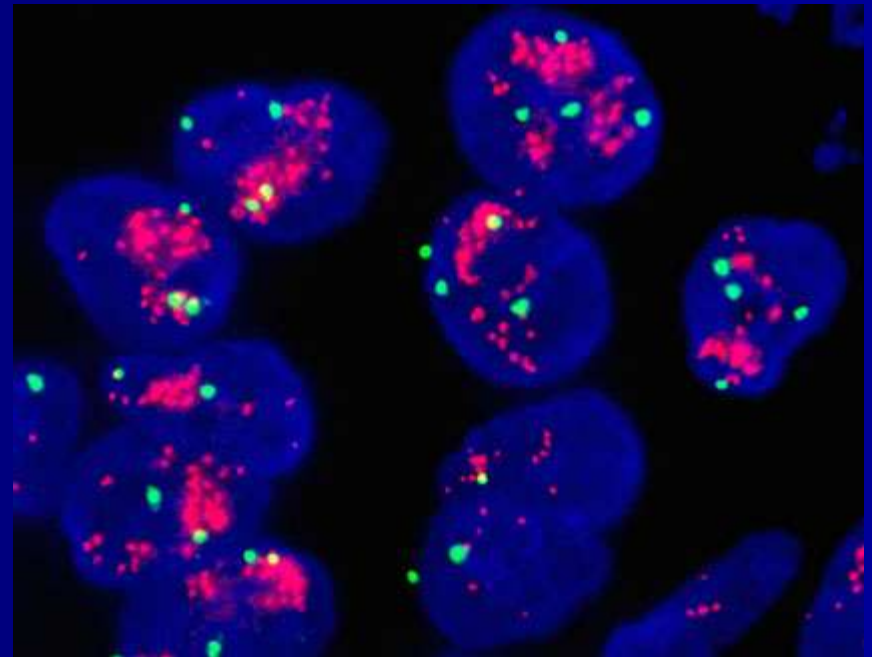


Sonde EBER détecte EBV

# Hybridation in situ

- amplification de gène par augmentation du nombre de copies :

*Ex : Cerb2* dans le KC du sein



# **Techniques spéciales liées au prélèvement**

# Techniques spéciales liées au prélèvement

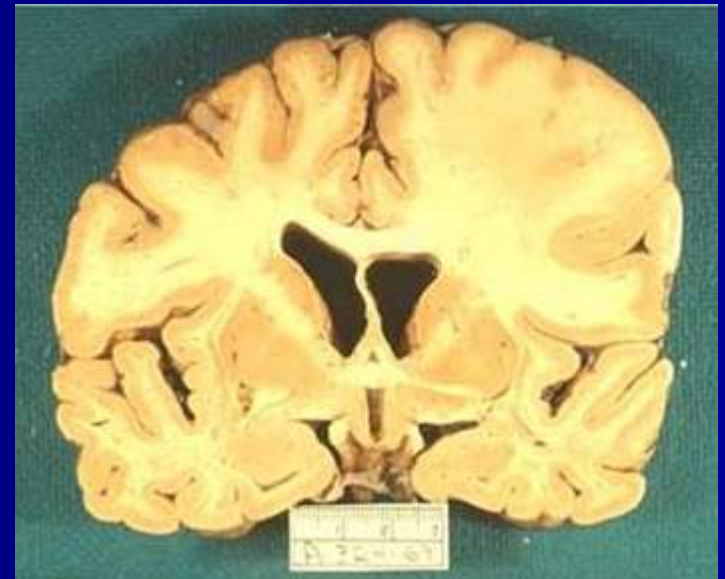
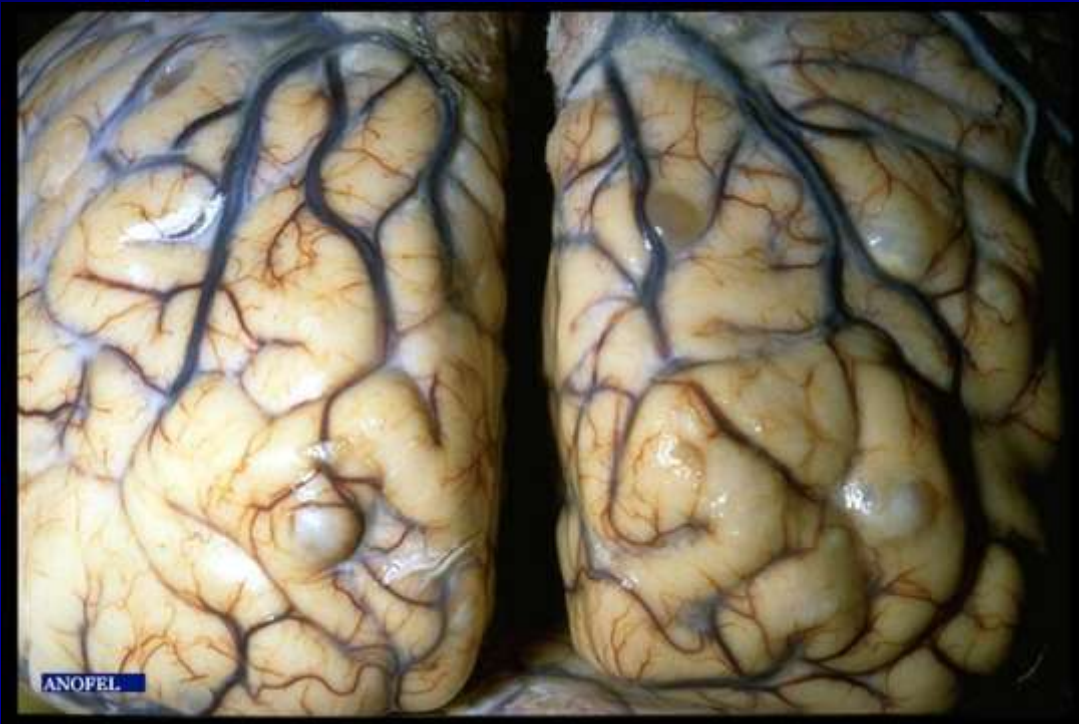
- **Prélèvement osseux** : consistance supérieure à la paraffine.
- **Deux techniques peuvent être utilisées:**
  - Technique de décalcification par bain dans une solution d'acide faible puis inclusion en paraffine +++
  - Inclusion en résine plastique permettant d'obtenir des coupes de 1 à 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur dite " semi-fines ", sans

# Techniques spéciales liées au prélèvement

## ■ Encéphale :

- L'encéphale est un tissu trop fragile pour être tranché avant fixation →  
Fixation monobloc
- La fixation de l'encéphale est une étape longue, d'environ 6 à 8 semaines.

# Encéphale



# CONCLUSIONS

- La qualité des techniques de laboratoire est dépendante de la prise en charge initiale du prélèvement
- Une erreur au stade initial compromet le diagnostic
- Le diagnostic repose sur une confrontation des éléments cliniques, paracliniques et histopathologiques