

# TECHNIQUE

2<sup>e</sup> partie

# 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

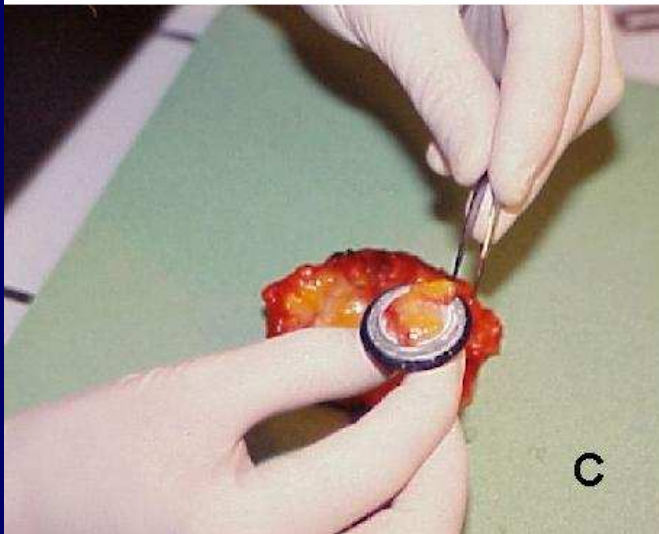
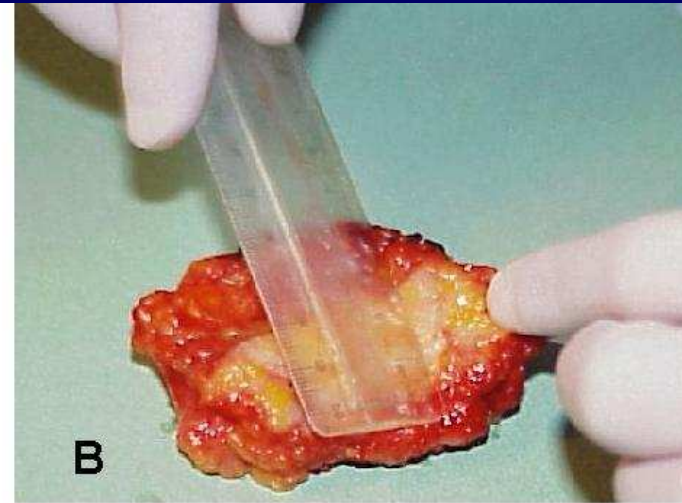
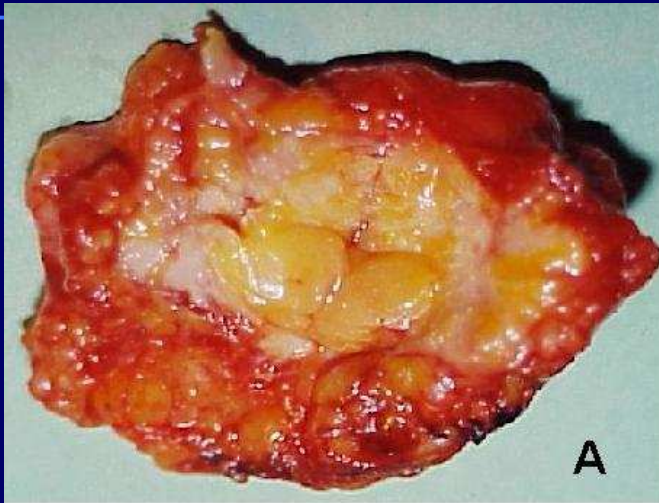
- **Objectifs :**

- 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 + + +**

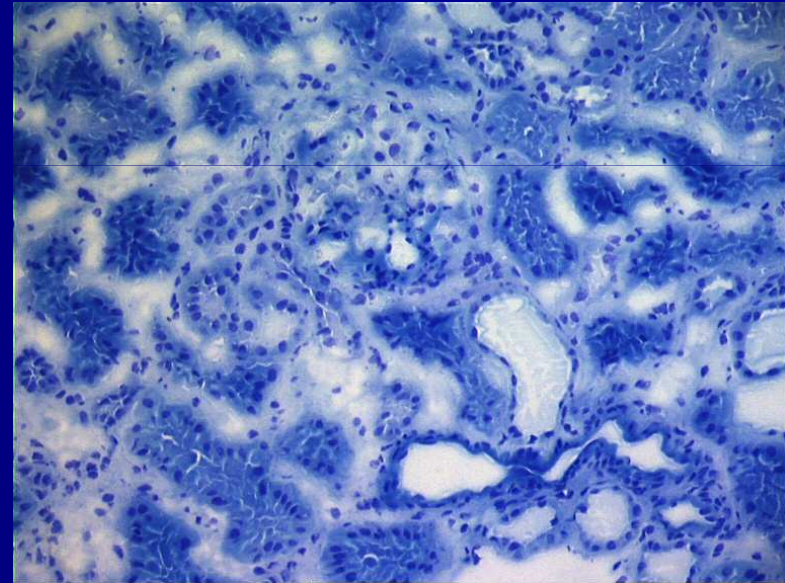
- **2 techniques : coupe congelée (++) et cytologie**

# Examen extemporané d'une tumorectomie mammaire



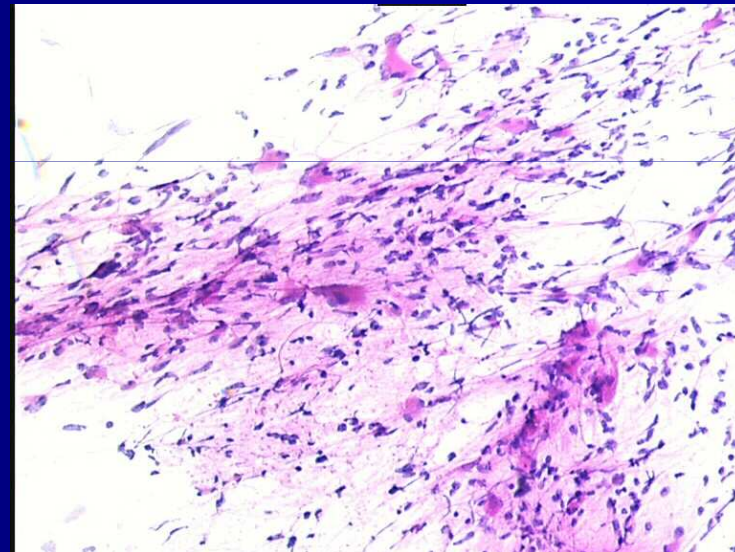
# Extemporané

- 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 systematiquement contrôlé par un examen histologique standard, le fragment analysé étant fixé après décongélation
- Le résultat est noté dans le compte rendu final

# HISTOCHIMIE

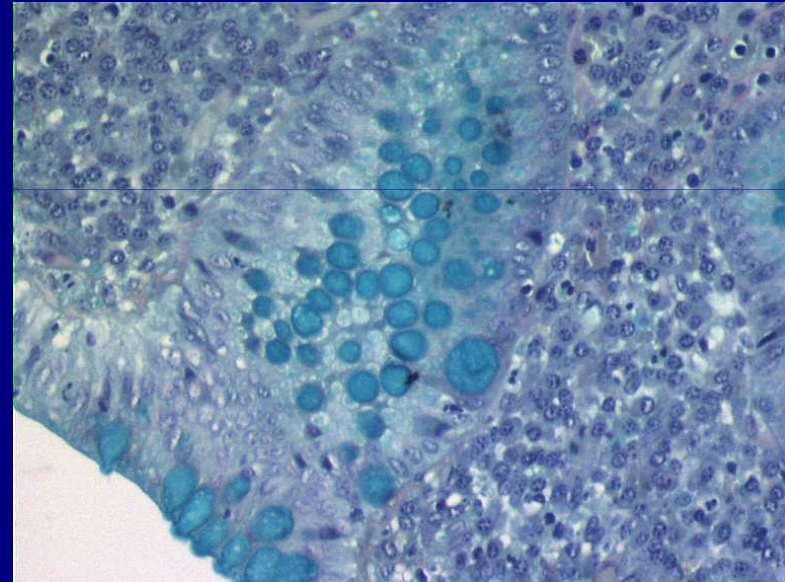
- Colorations spéciales permettant :
  - Etude des produits de sécrétion cellulaire
  - Etude de la matrice extra cellulaire et recherche de dépôts
  - Recherche de microorganismes
- Lumière blanche, polarisée ou UV

# COLORATIONS SPECIALES

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

- **ex :**

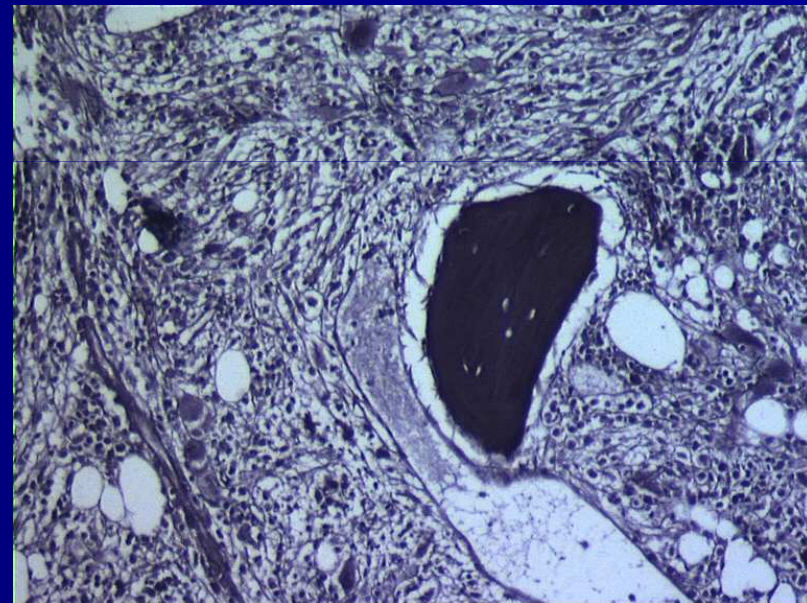
- glycogène coloré par PAS, avec réaction diastase sensible ;
- mucus, coloré par bleu alcian ou mucicarmin



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

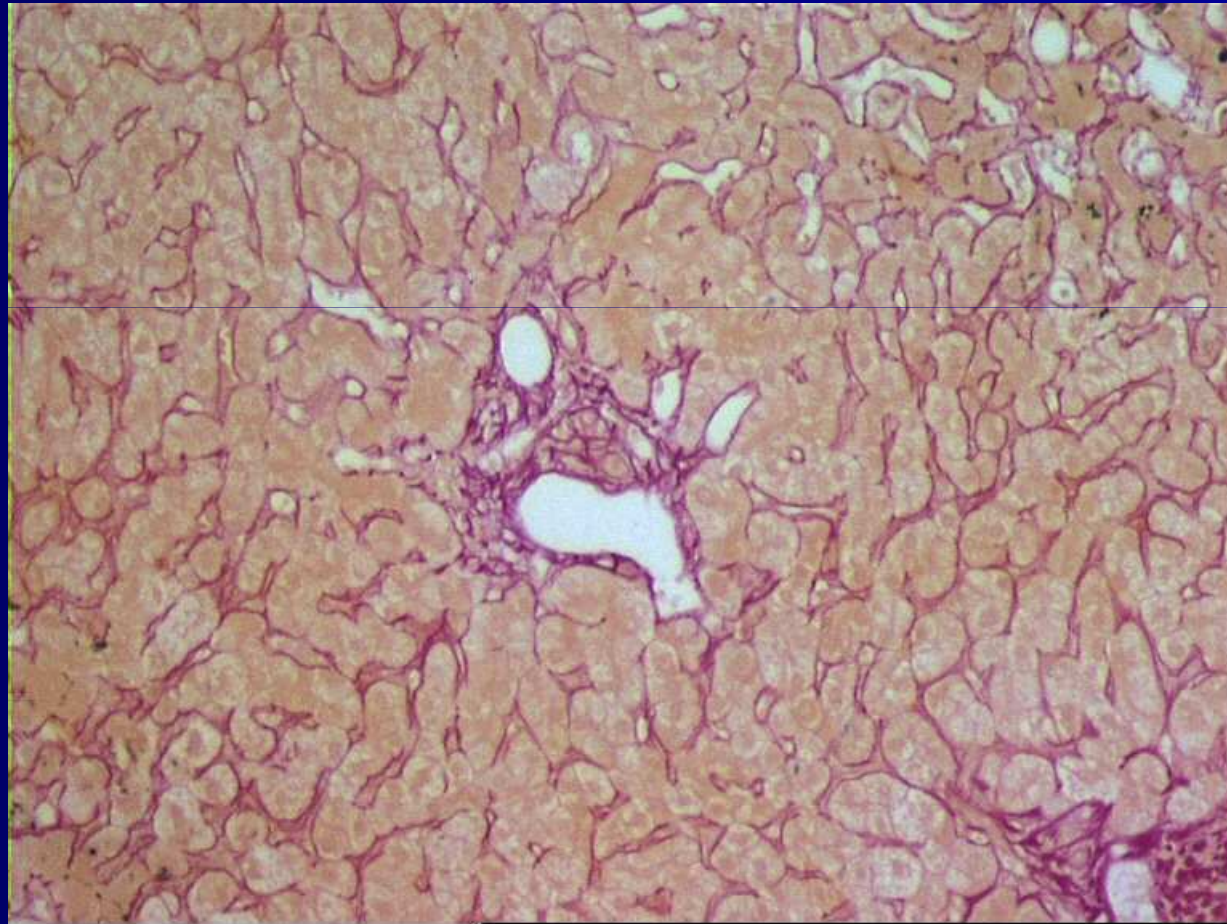
# COLORATIONS SPECIALES

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

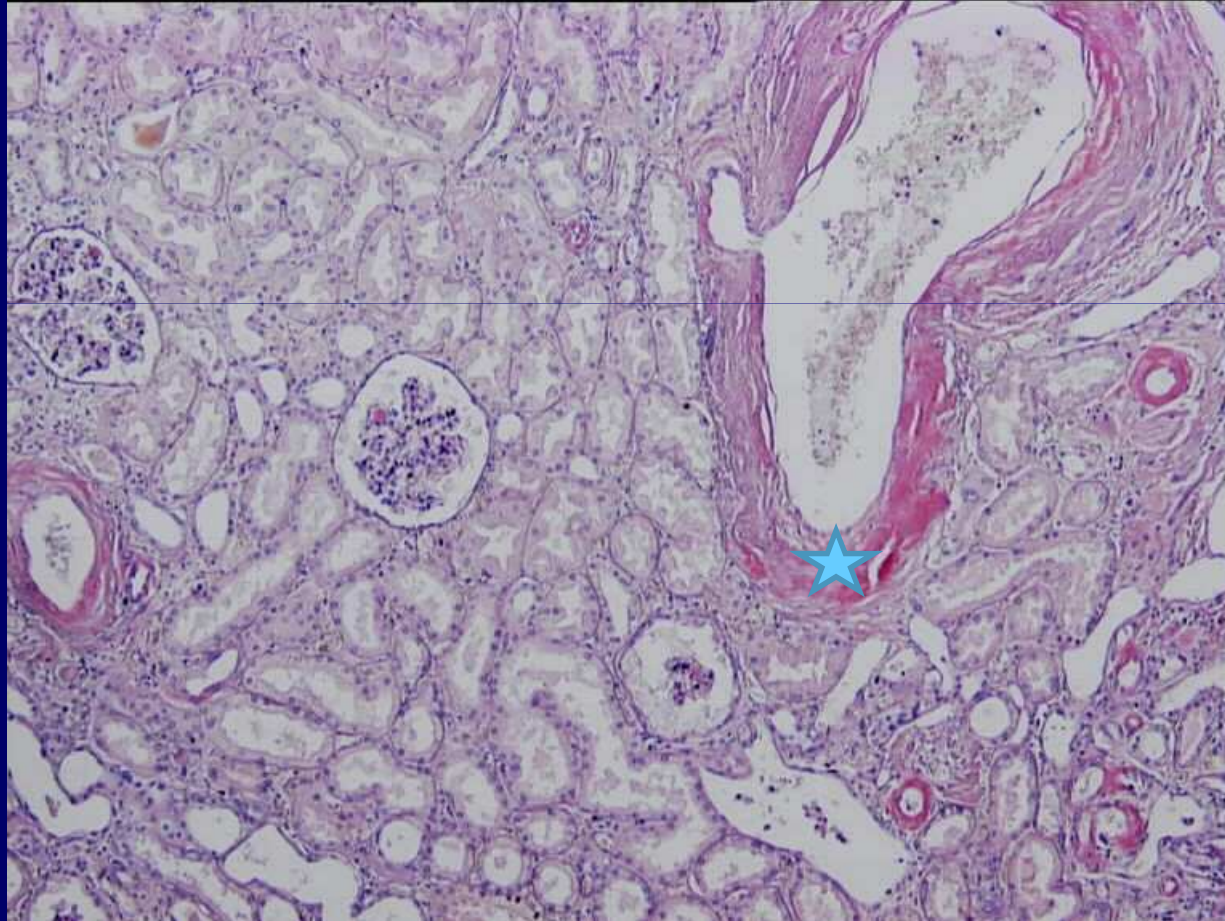


*Gordon : coloration de la réticuline en noir*

# ROUGE SIRIUS ET FIBROSE HEPATIQUE



# ROUGE CONGO / AMYLOSE

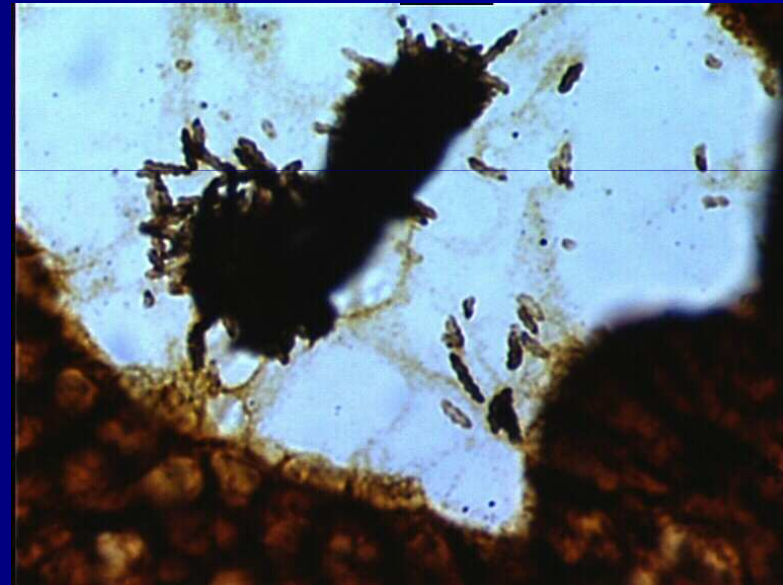


# COLORATIONS SPECIALES

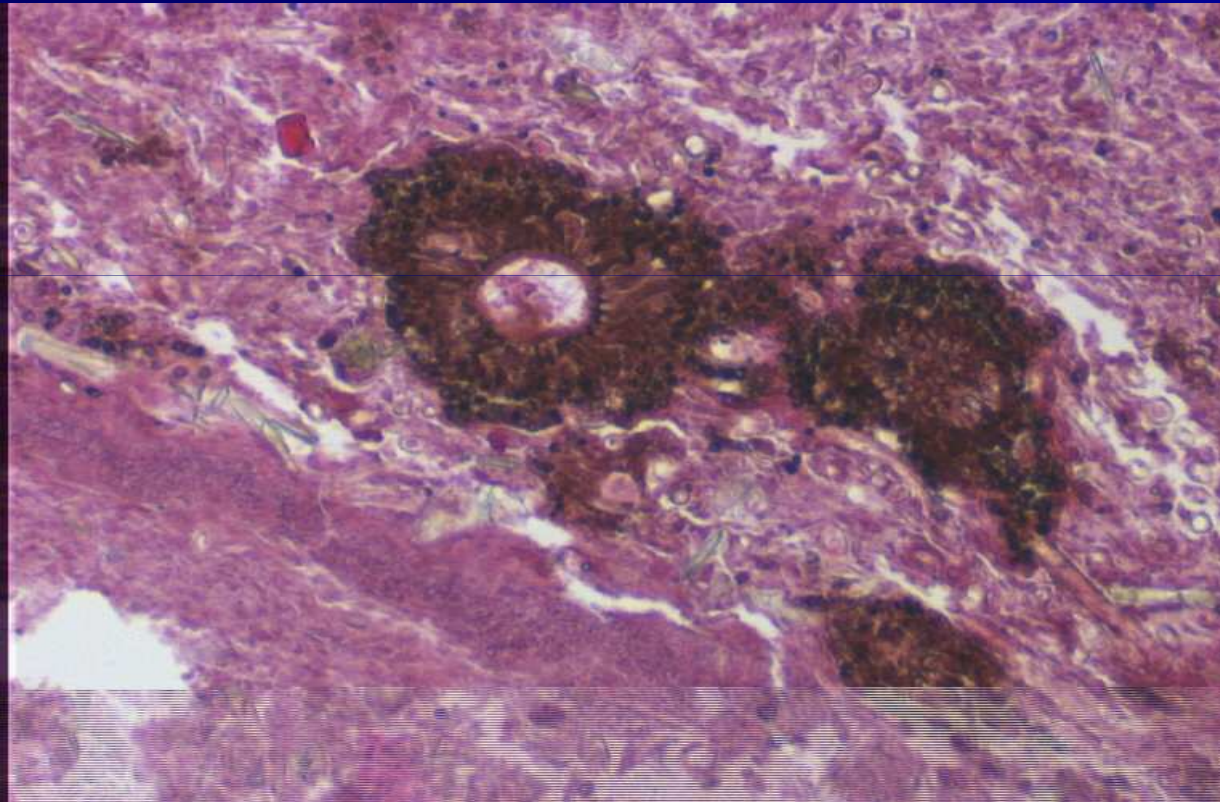
- organites intra-cytoplasmiques :
  - ex double striation des fibres musculaires lisses par hématoxyline phosphotungstique.

# 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 :

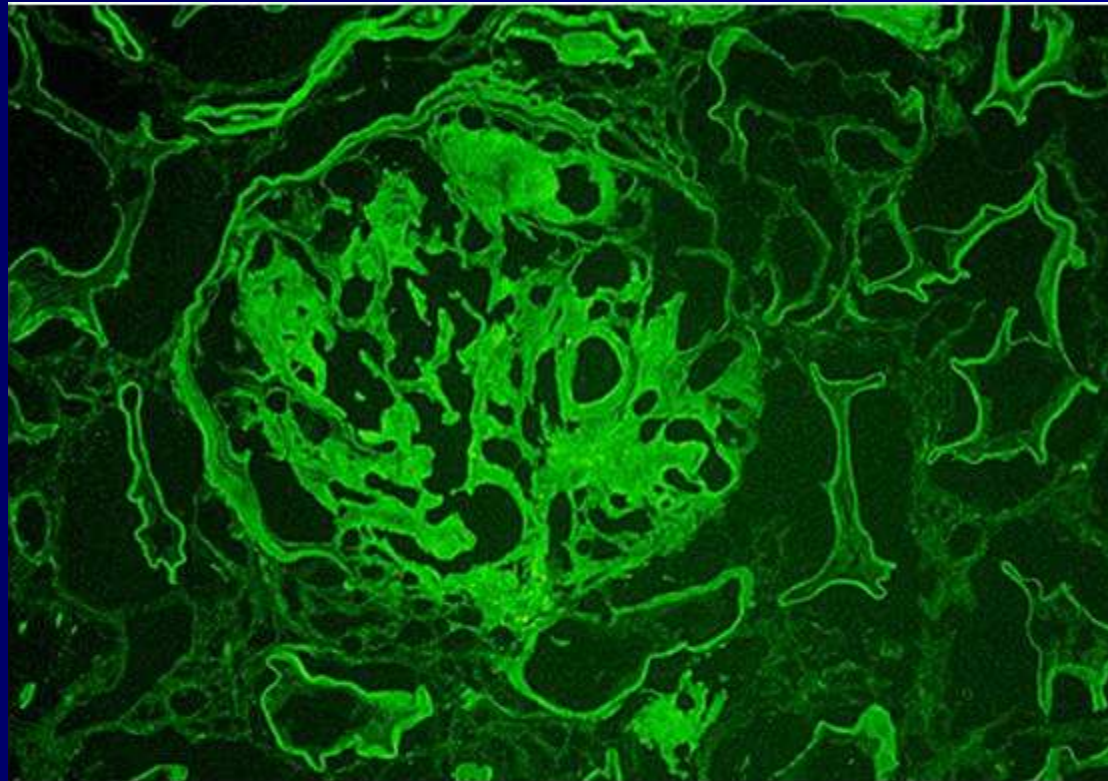
- anticorps couplé à une enzyme, sur coupe tissulaire
- Utilisation très large de l'IHC en pratique +++
- Méthode indirecte

## ■ Immunocytochimie :

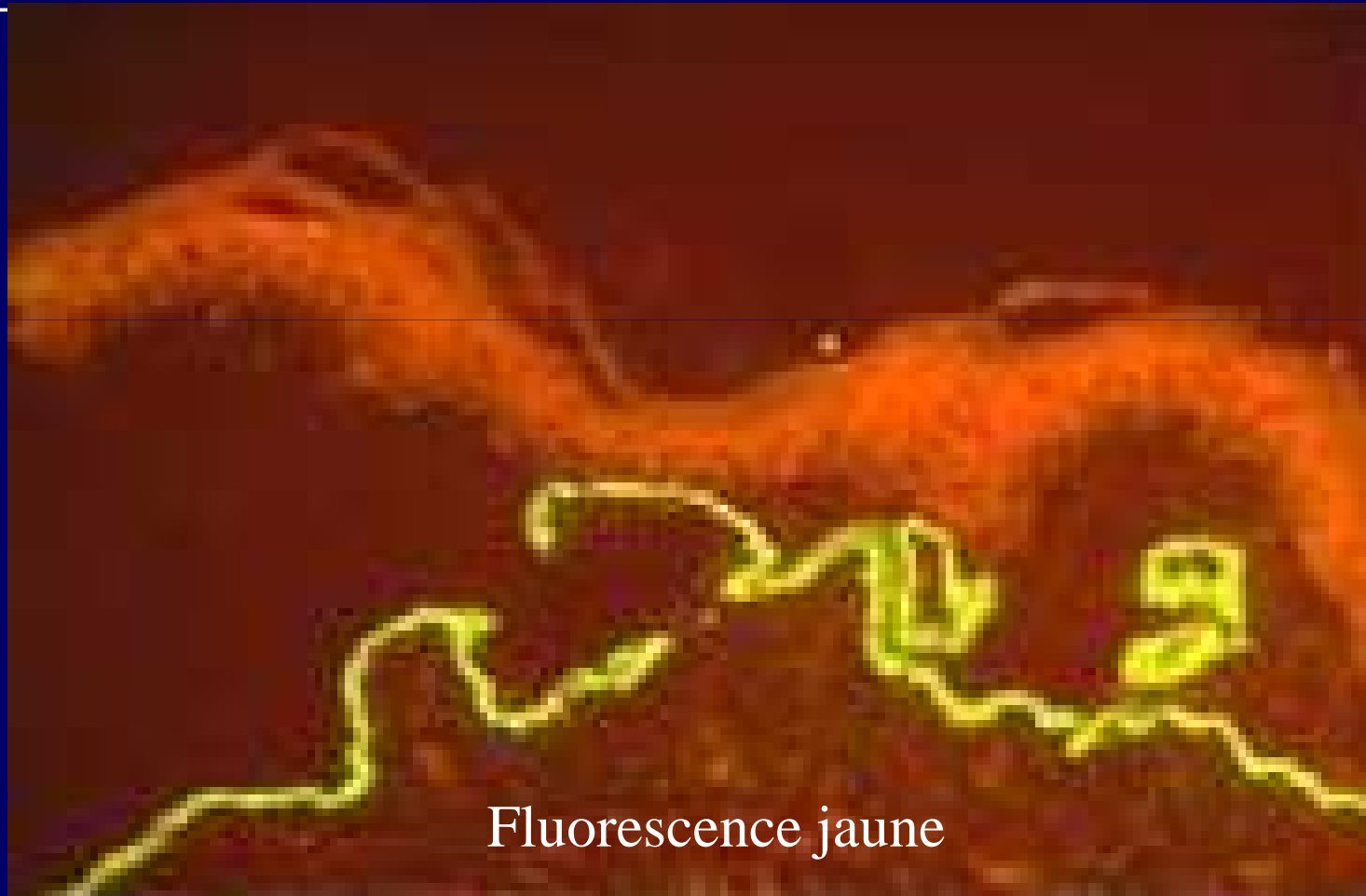
- anticorps couplé à une enzyme, sur prélèvement cytologique
- Méthode indirecte

*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)



Fluorescence jaune

# Immunohistochimie

The image shows a histological section of breast tissue stained with an anti-c-erbB2 antibody. The cells are stained brown, indicating the presence of the c-erbB2 protein on the cell membrane. The staining is localized to the cell membranes, forming a distinct pattern of brown-stained cells. The nuclei are stained blue with hematoxylin. The overall appearance is that of a dense cluster of cells with prominent membrane staining.

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

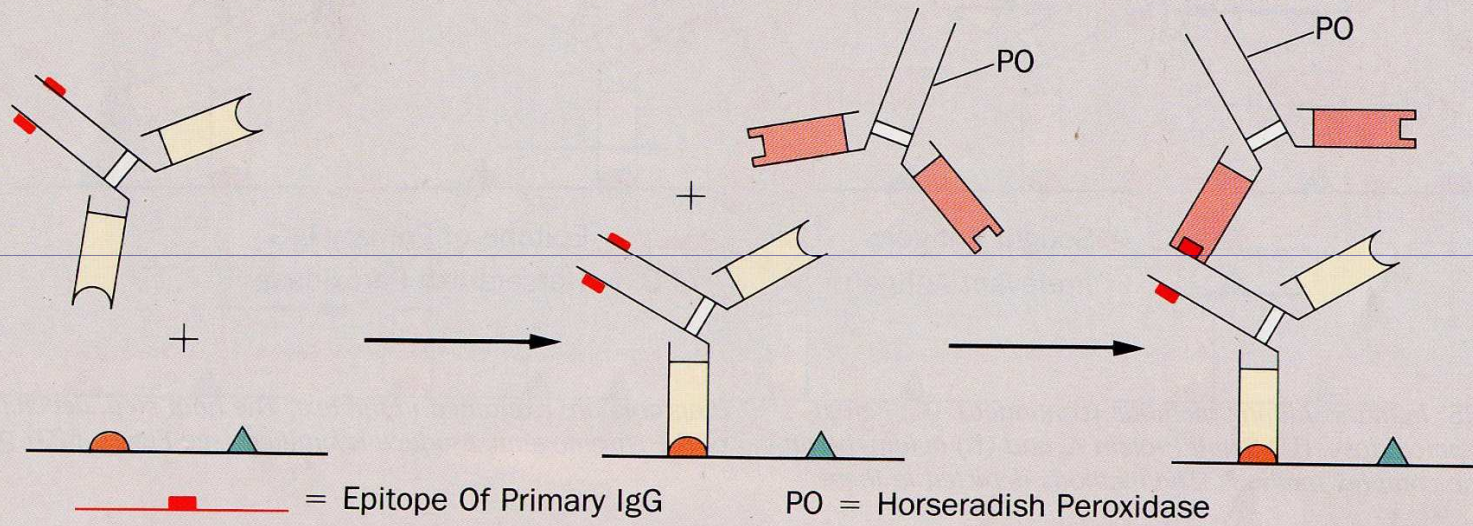
- méthode

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

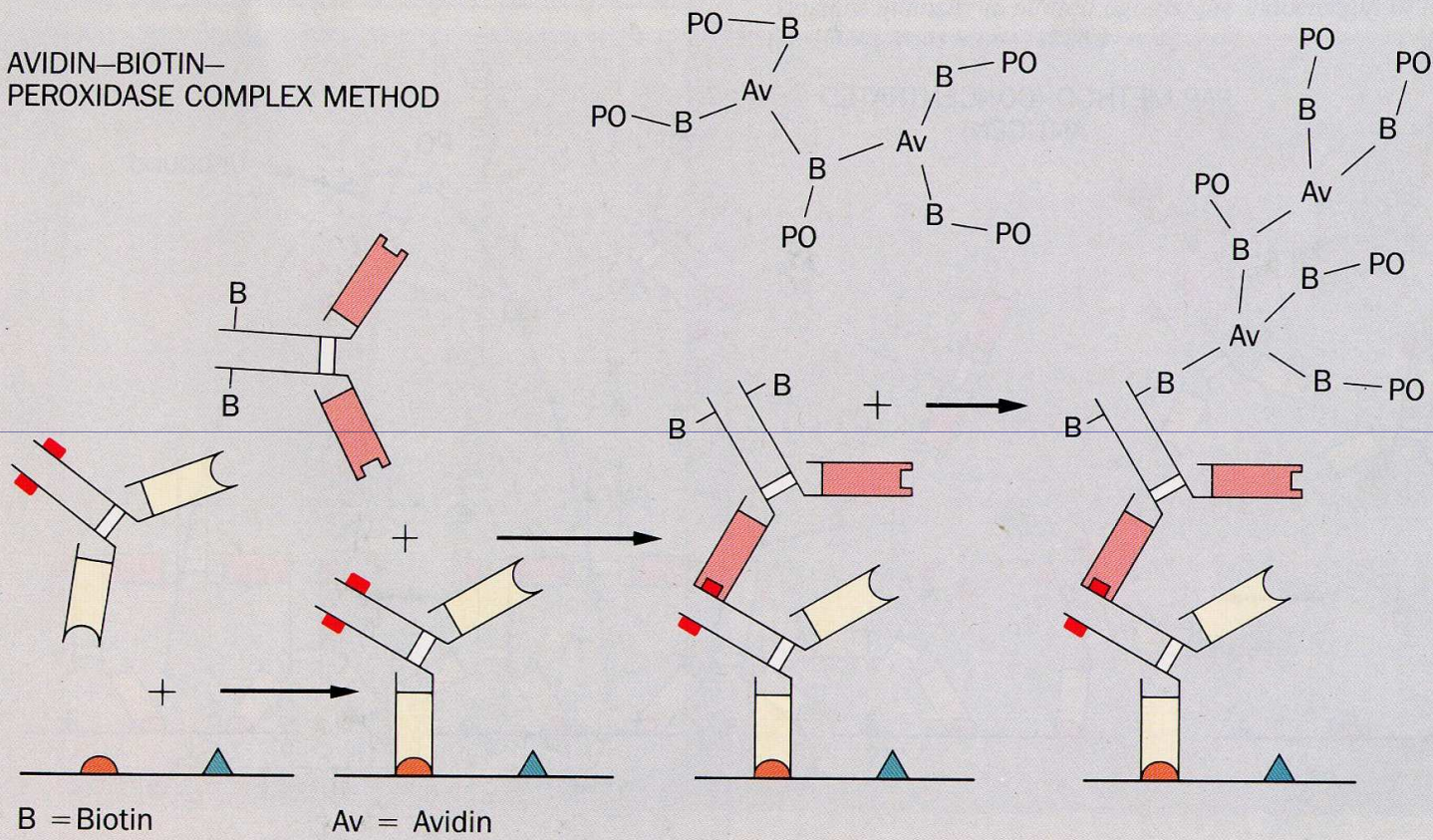
# Histoimmunologie

- 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

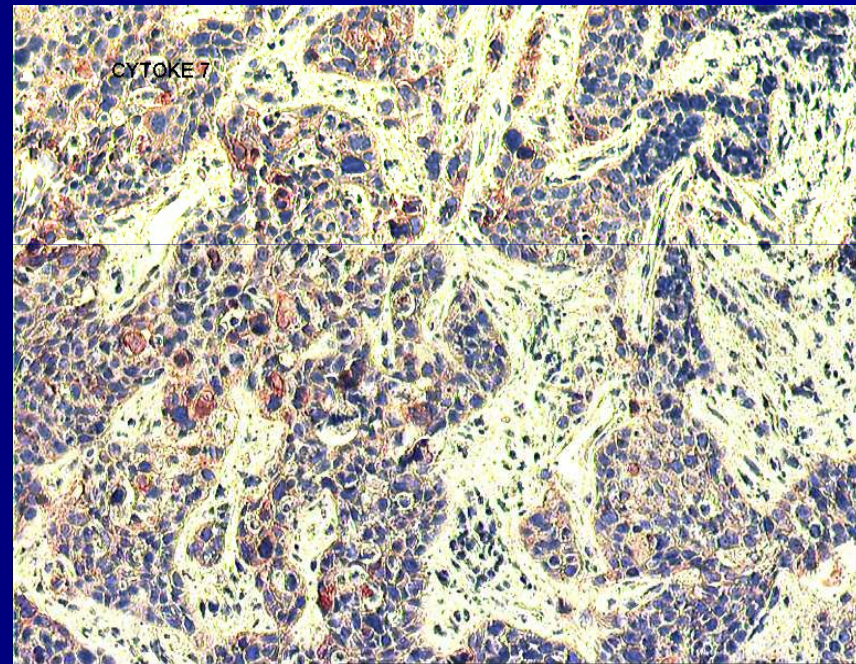


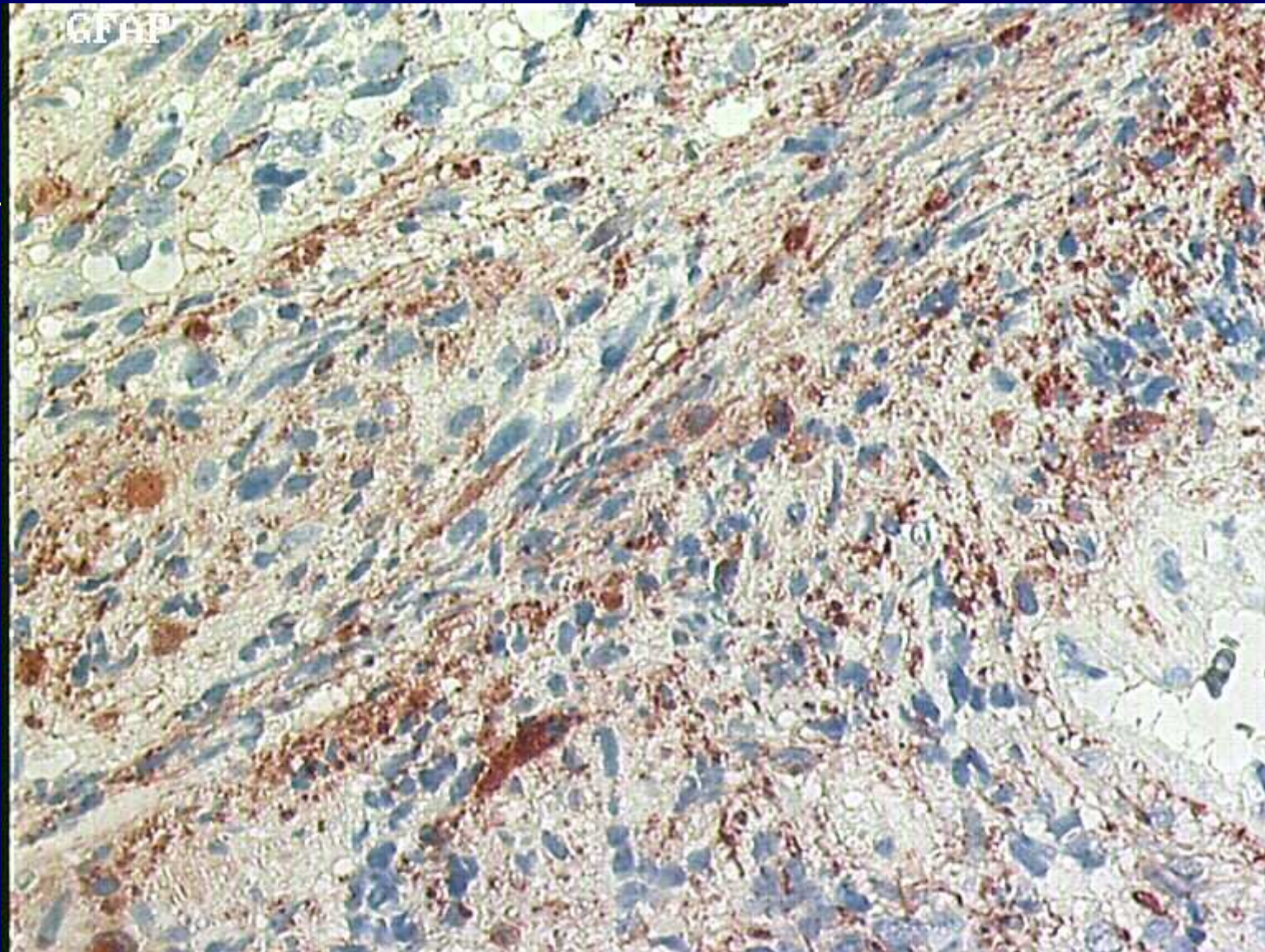
AVIDIN-BIOTIN-  
PEROXIDASE COMPLEX METHOD



# Histoimmunologie

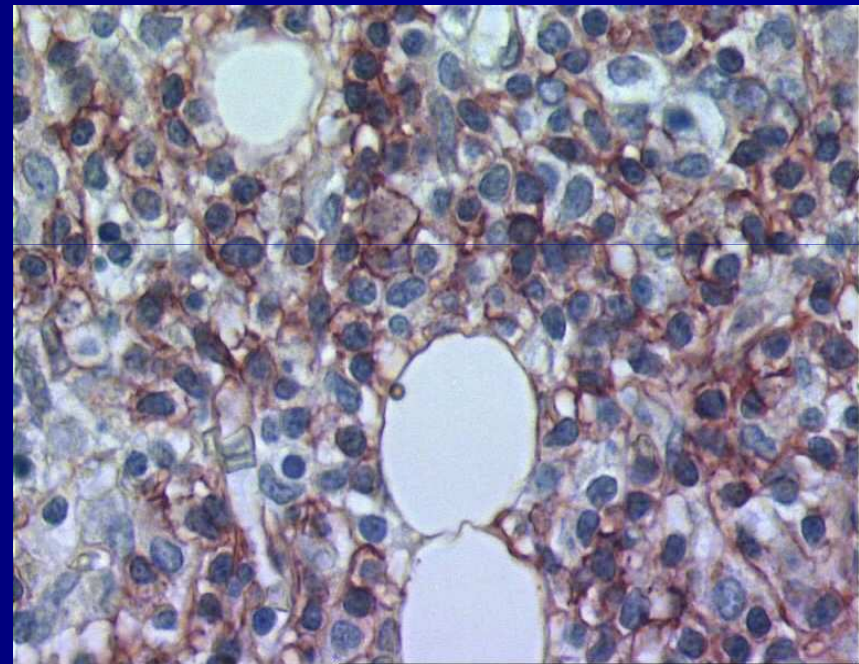
- Antigènes du cytosquelette :
  - filaments de cytokératine retrouvés dans les tumeurs malignes épithéliales;
  - filaments de desmines dans les tumeurs musculaires





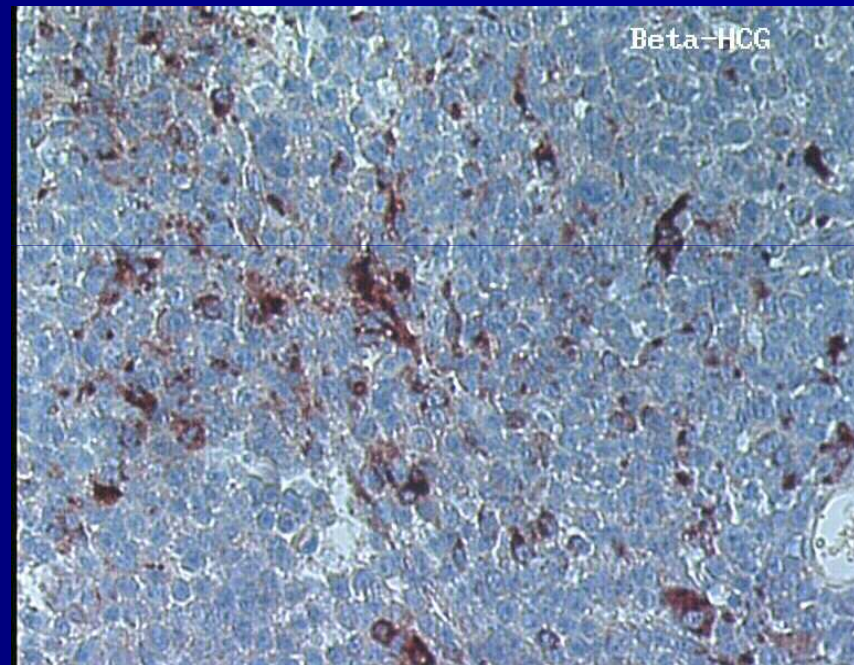
# Histoimmunologie

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



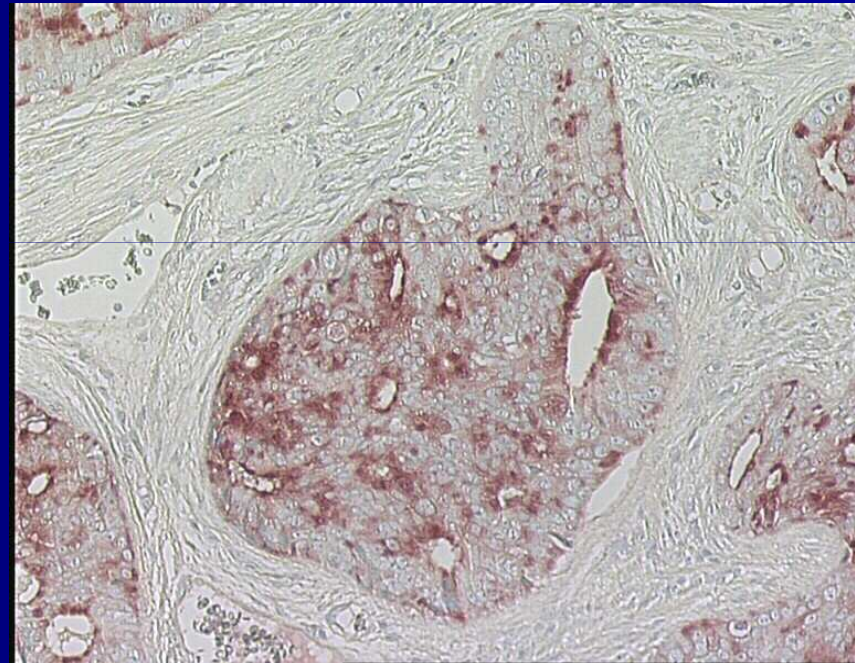
# Histoimmunologie

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



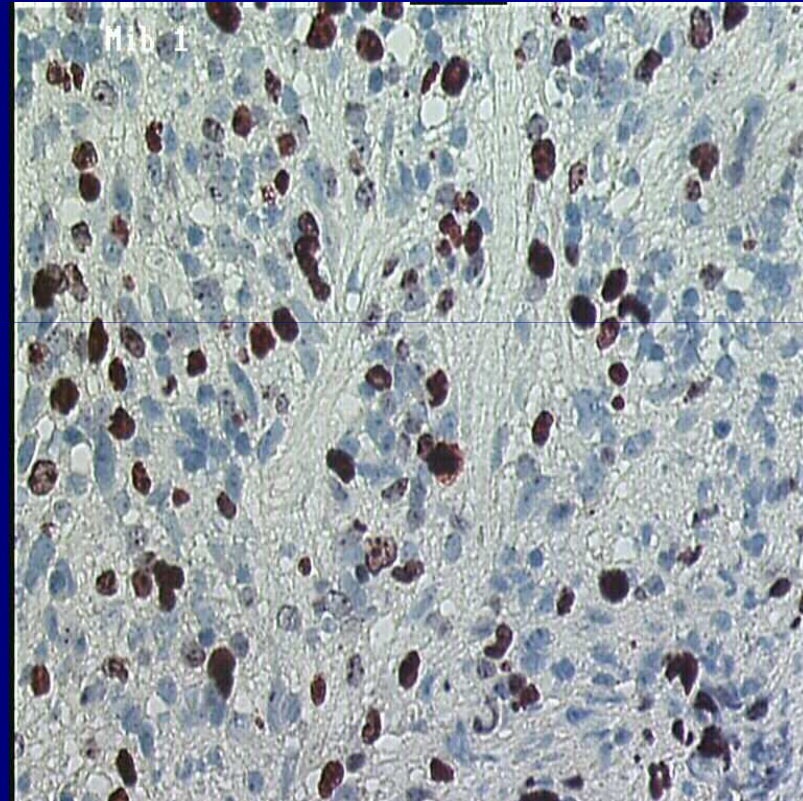
# Histoimmunologie

- 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

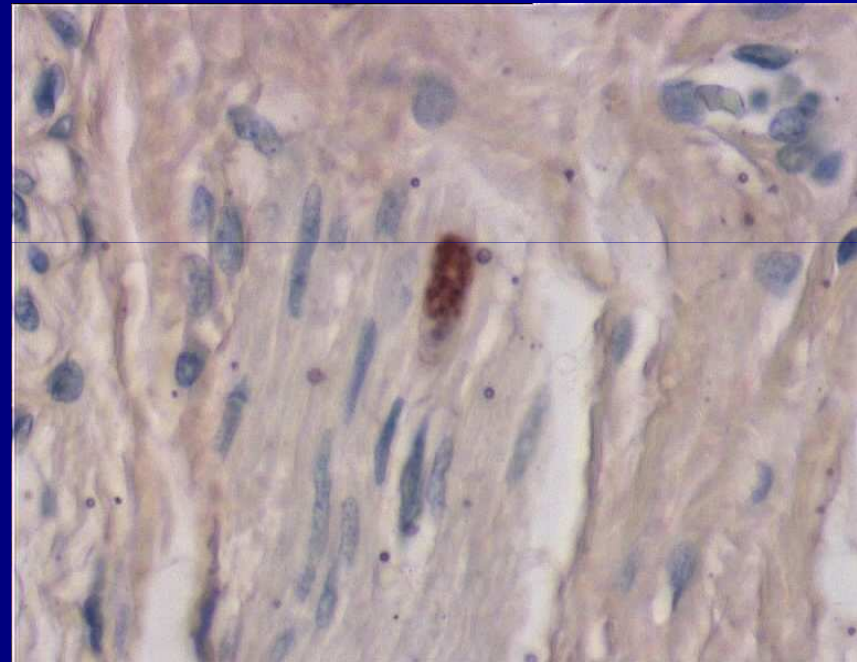


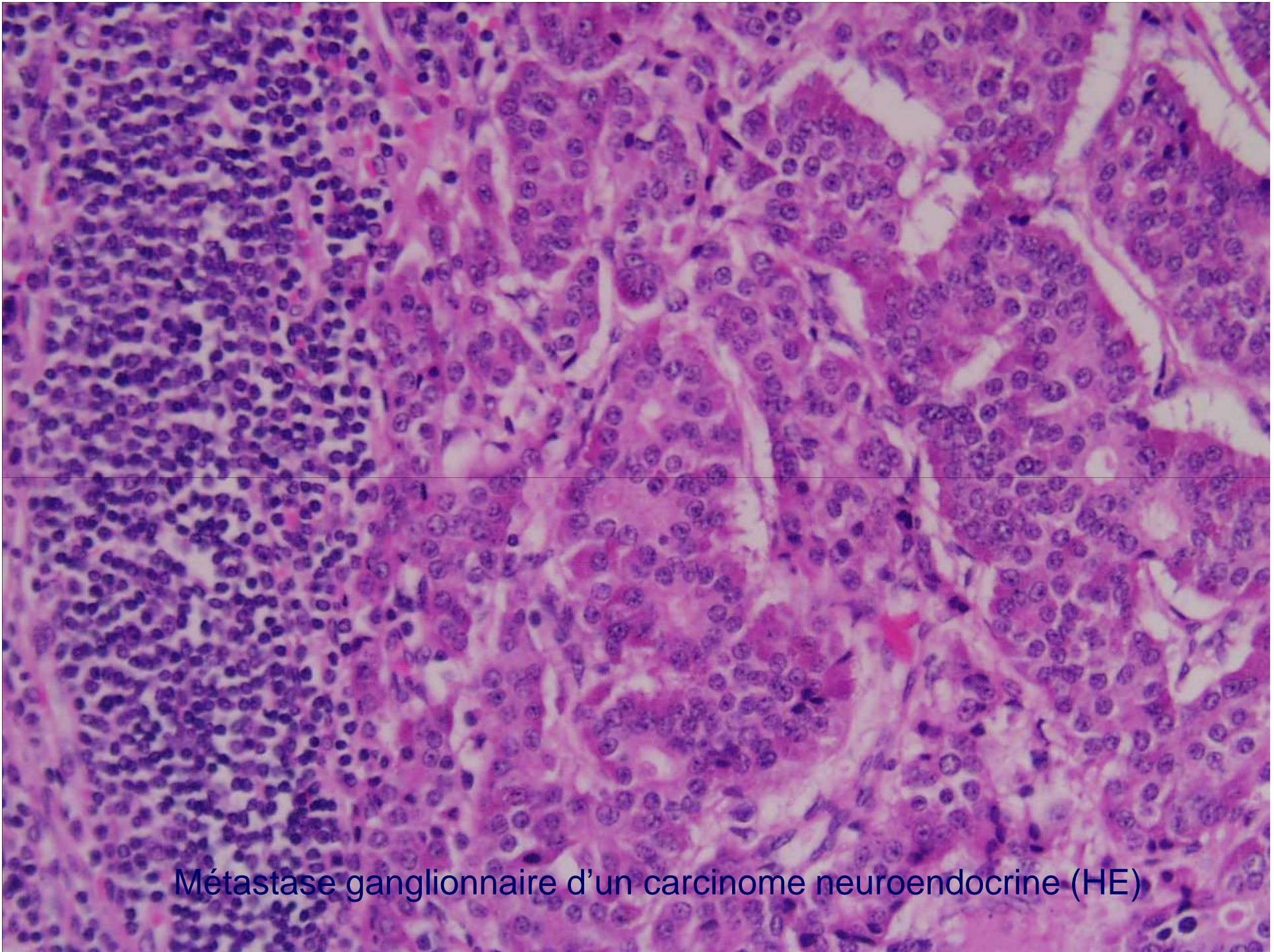
# Histoimmunologie

## ■ Agents

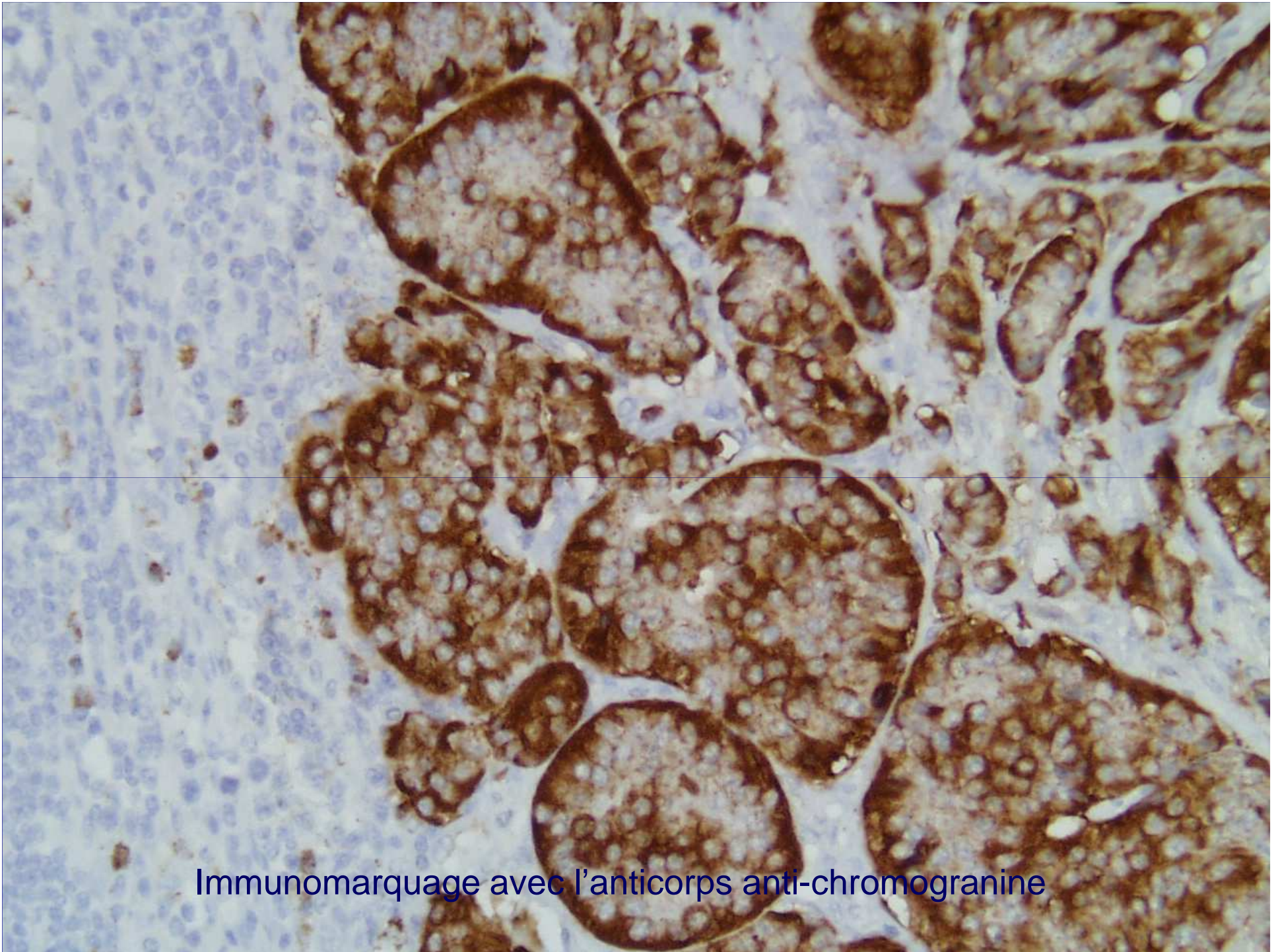
microbiologiques :

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

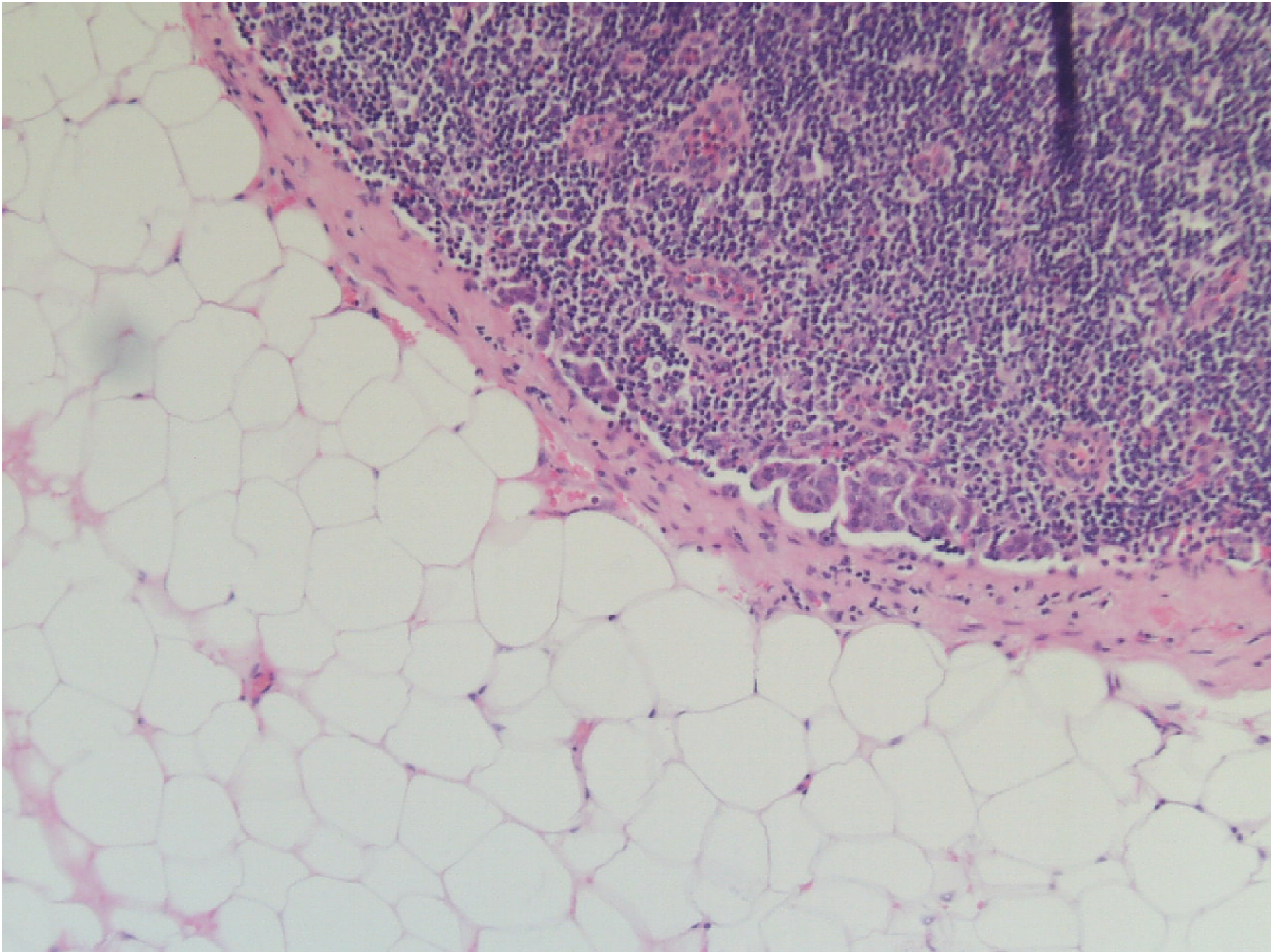


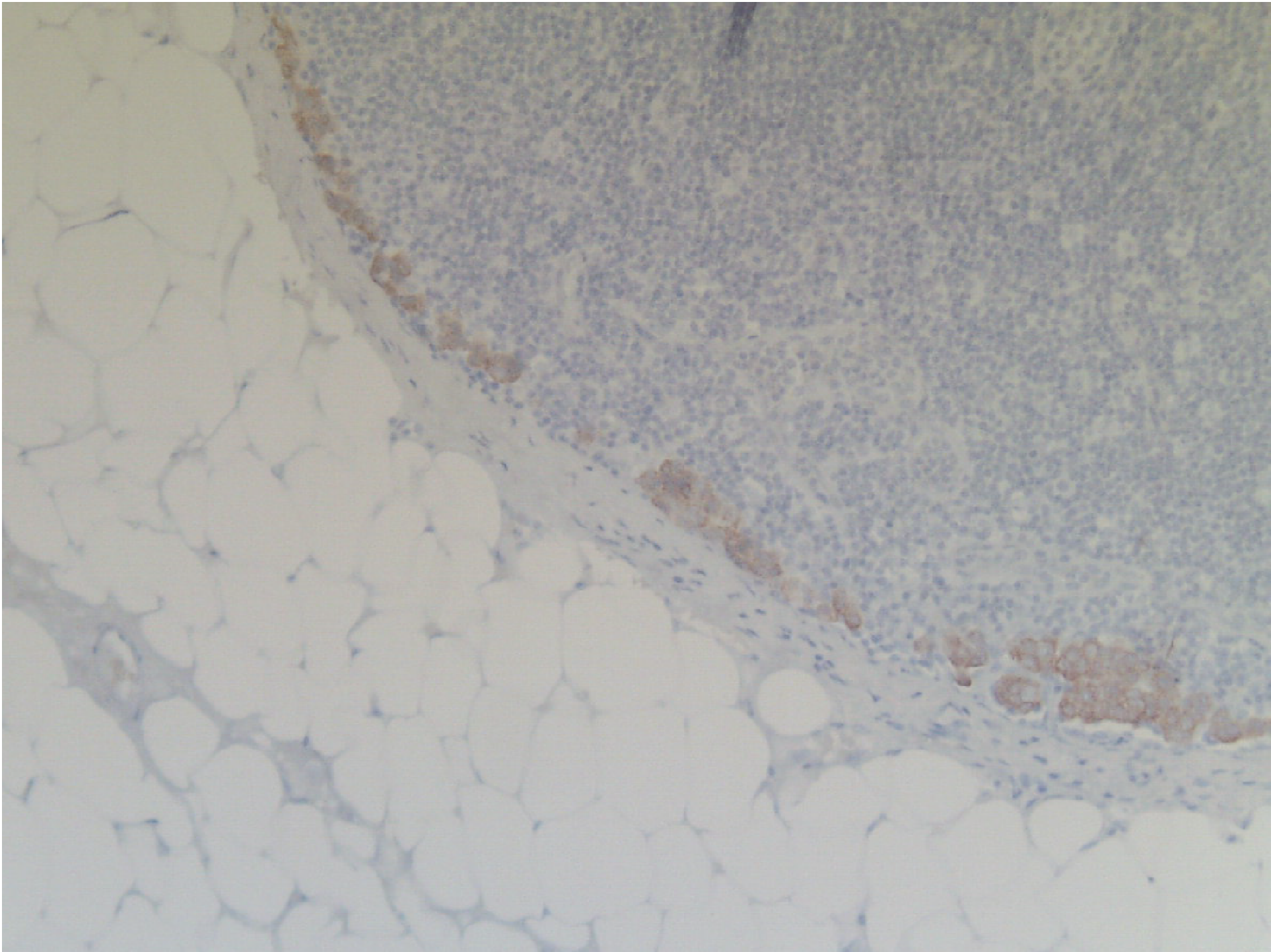


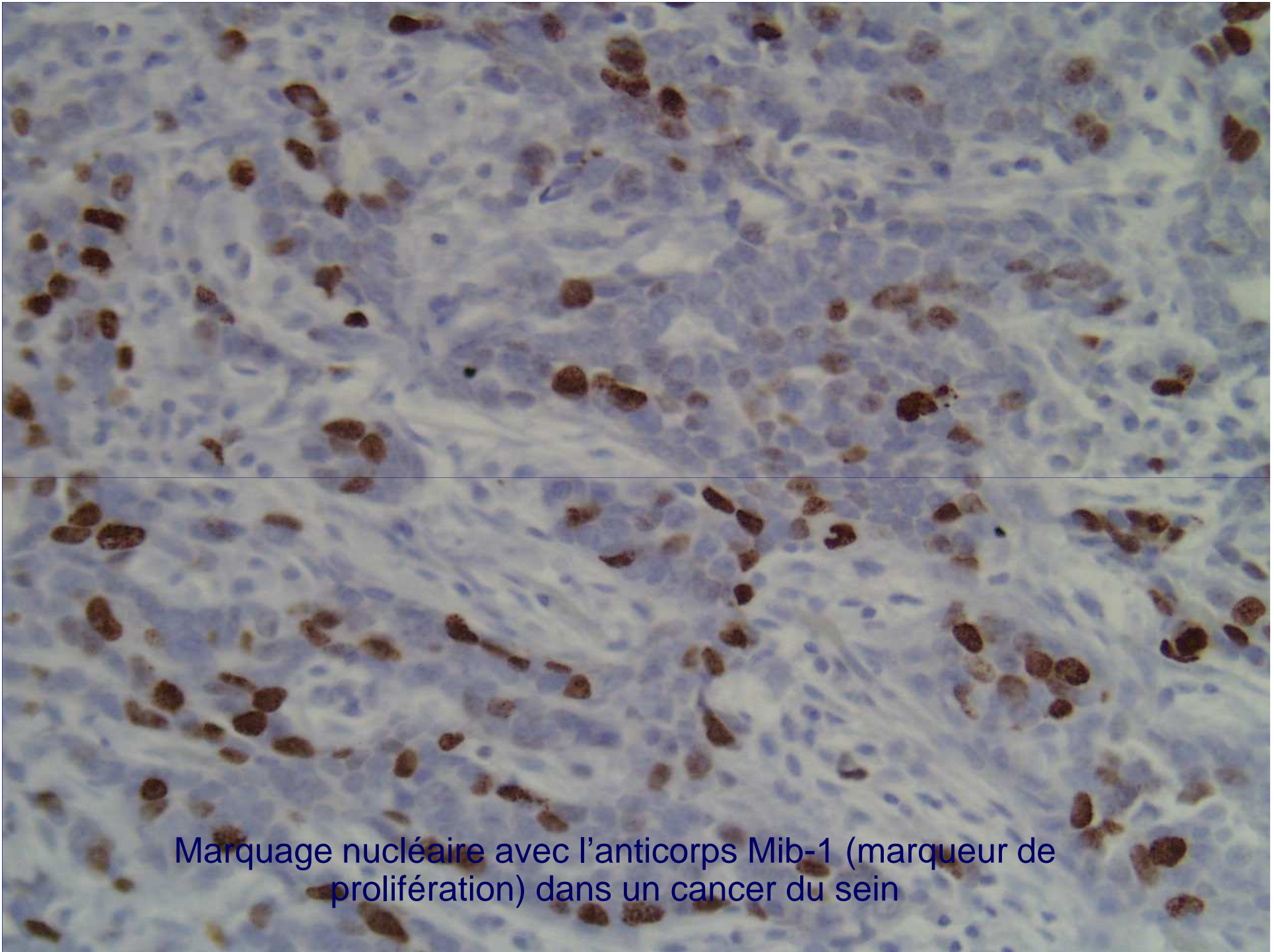
Métastase ganglionnaire d'un carcinome neuroendocrine (HE)



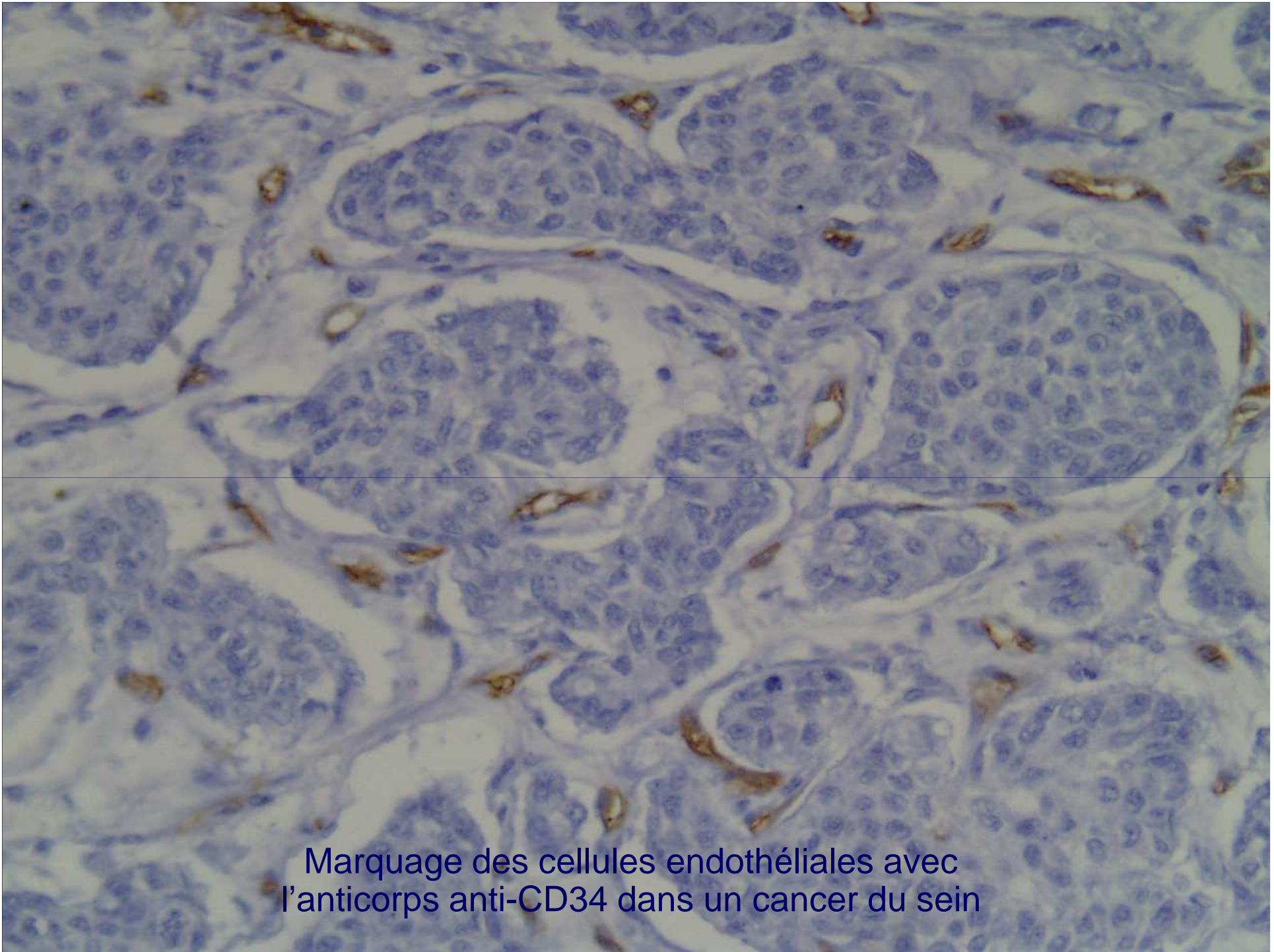
Immunomarquage avec l'anticorps anti-chromogranine





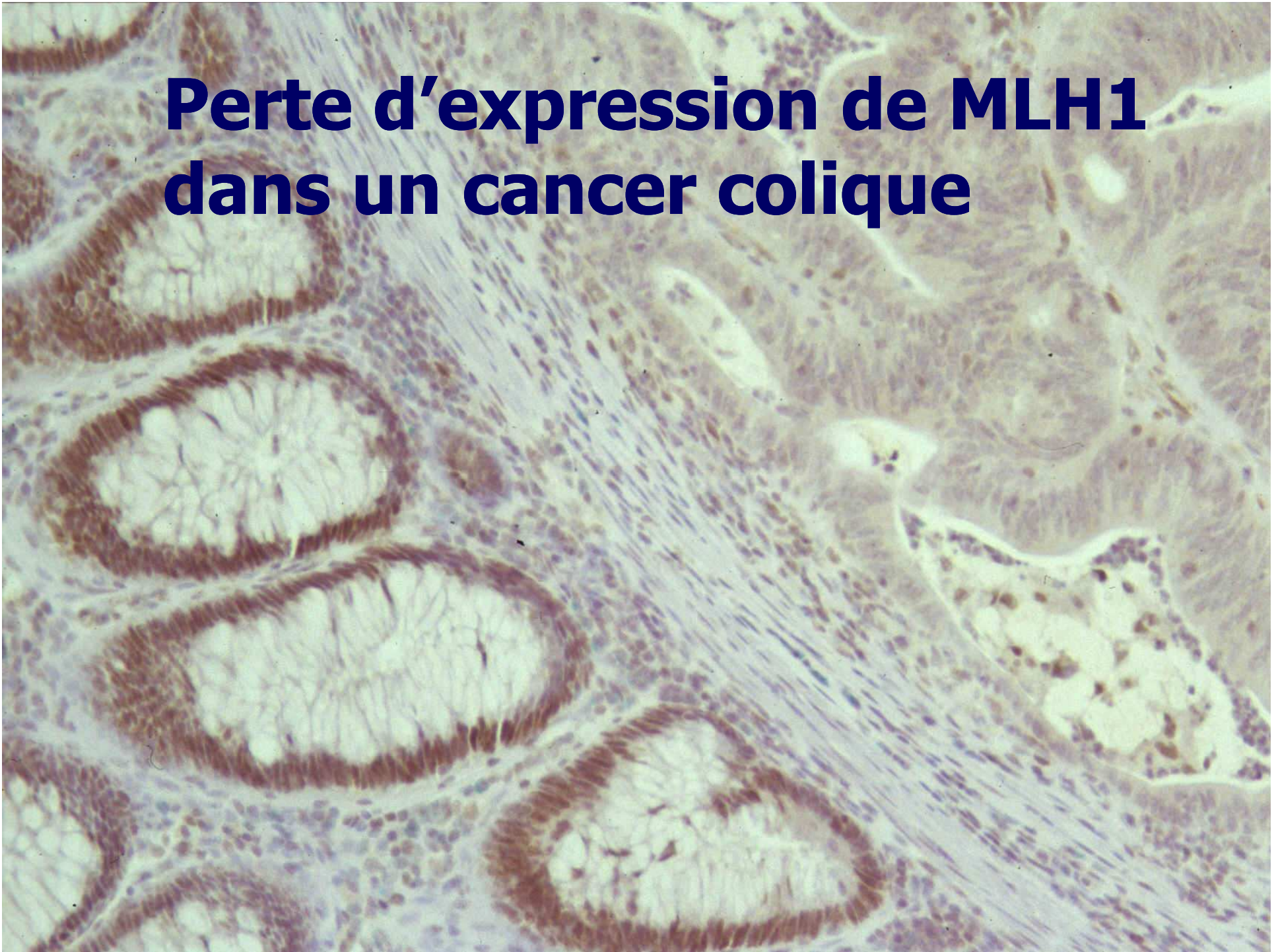


Marquage nucléaire avec l'anticorps Mib-1 (marqueur de prolifération) dans un cancer du sein



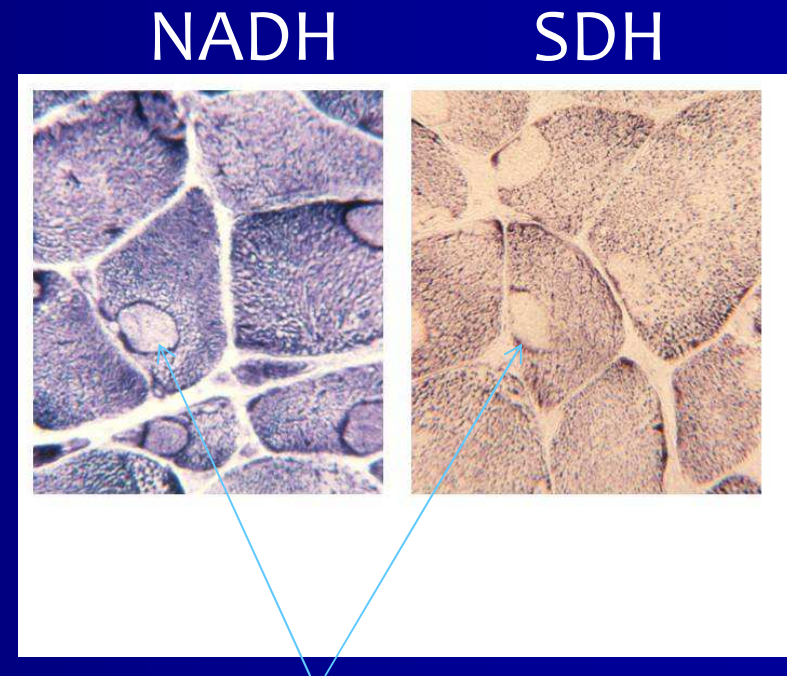
Marquage des cellules endothéliales avec l'anticorps anti-CD34 dans un cancer du sein

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



# Histo-enzymologie

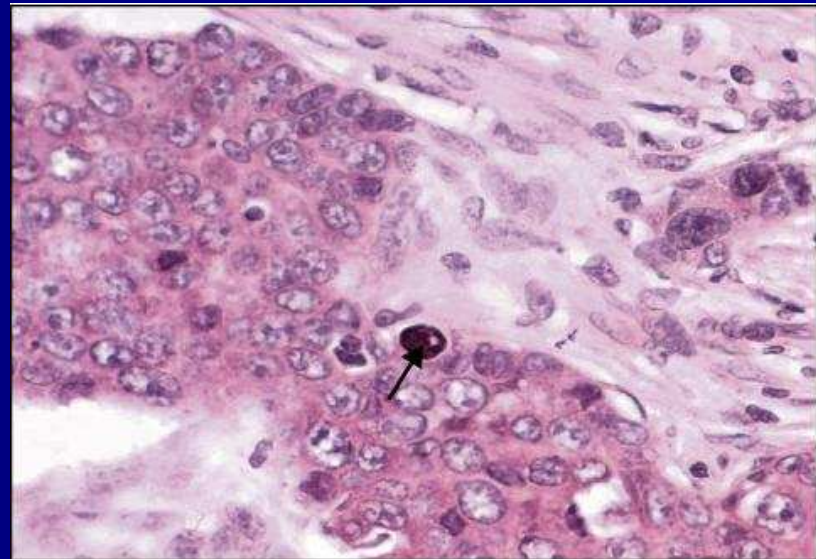
- Mise en évidence d'une activité enzymatique
- Sur coupe congelée
- Indication : étude des biopsies musculaires pour recherche de myopathie



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

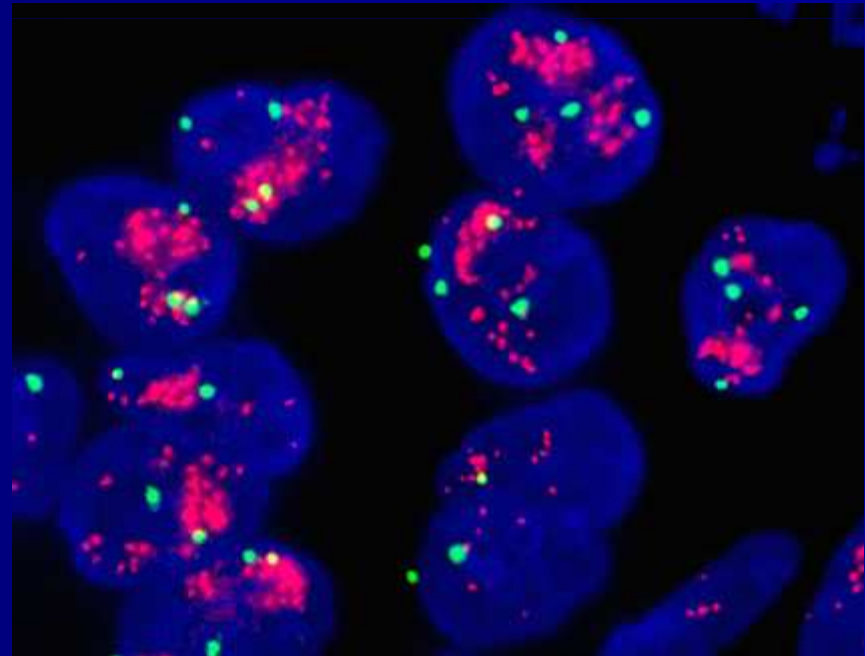


Sonde EBER détecte EBV

# 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

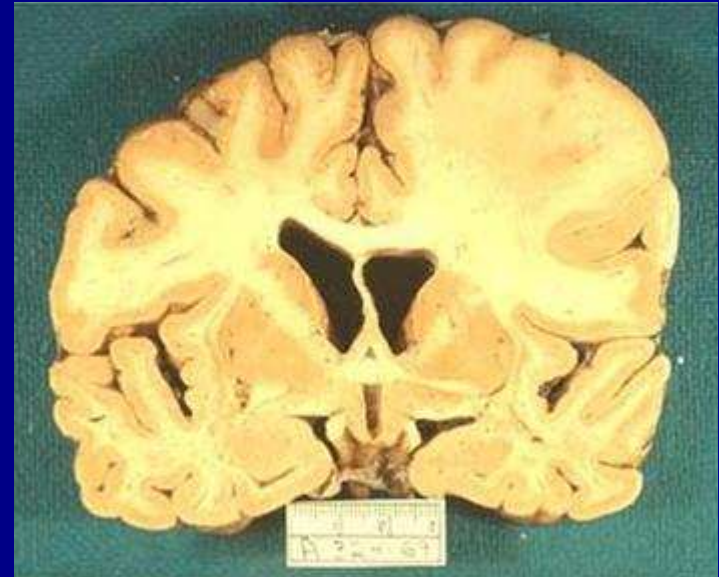
- Prélèvement osseux : consistance supérieure à la paraffine.
- Deux techniques peuvent être utilisées:
  - Technique de décalcification par bain dans une solution d'acide faible puis inclusion en paraffine +++
  - Inclusion en résine plastique permettant d'obtenir des coupes de 1 à 2  $\mu\text{m}$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