

4 octobre 2011

---

*Les diapos du Pr. MICHIELS sont toutes disponibles sur le site carabinsniçois.fr rubrique L2 > UE BME.*

*On ne les a pas insérées dans cette ronéo car pour la quasi-totalité il s'agit d'observations microscopiques auxquelles, avouons-le, personne ne comprend grand chose ^^ (j'ai quand même essayé d'en mettre quelques-unes au début, mais vous vous rendrez vite compte de la potentielle inutilité de la chose).*

*Pour le reste ce sont des photos des appareils utilisés en anapath et de la tête que peut avoir une lame de préparation microscopique, et entre nous, c'est pas ce qui nous importe le plus.*

*D'autre part, vous remarquerez que certaines diapos présentes sur carabinsniçois.fr ne sont pas mentionnées dans cette ronéo, tout simplement parce que le prof les a sûrement passées rapidement et qu'il a préféré parler d'autres choses qui avaient plus d'intérêt pour lui.*

*De toute façon, comme l'a dit le Pr. MICHIELS lui-même, il y a beaucoup de "blabla" autour de ces photos, et mêmes les diapos ne sont pas très importantes puisqu'il est bientôt sensé nous donner un poly comprenant tous les éléments importants et nécessaires à l'apprentissage de sa matière... enfin, bientôt... espérons qu'il dise vrai ^^*

*Sur ce, chers confrères, bon amusement ;)*

---

## METHODES D'ETUDE DES LESIONS

Le but du conditionnement est de transformer un produit brut (soit à base de cellules soit à base de tissu) en préparation examinable au microscope et apte à pouvoir donner un diagnostic.

On est appelé d'emblée à faire deux grandes classes de prélèvements :

### - Les échantillons cellulaires

- **Liquides** : qui dit *liquide d'épanchement* dit presque toujours pathologie. Quand vous avez une grosse articulation pleine de liquide c'est que celle-ci ne marche pas. L'*épanchement pleural* : si vous avez du jus dans la plèvre c'est qu'à priori il y a un problème. Soit infectieux, soit cardiaque, soit tumoral. Même réflexion au niveau gastrique, si vous avez du jus dans le ventre (*ascite*) c'est très souvent que le foie ne marche pas (mais ça peut être également un problème sceptique ou un problème cancérologique). Il existe aussi des *liquides physiologiques* : urine, LCR ...
- **Produits d'aspiration** qui sont en général prélevés par les radiologues sous scanner ou sous échographie, au moyen d'une aiguille fine qui permet de recueillir des échantillons cellulaires.
- **Frottis** qui peuvent être des frottis cutanés, mais qui sont pour la plupart des frottis cervico utérins qui sont la base du dépistage.

### - Les tissus

- **Biopsie** qui correspond au petit échantillon prélevé (soit à la pince soit au bistouri soit avec une aiguille) sur une masse ou sur un organe pour obtenir un diagnostic. C'est un fragment de lésion ou un fragment de tissu.
- **Biopsie exérèse** (c'est ce qu'on a vu le matin avec la biopsie cutanée élargie sur le mélanome). Le même acte permet d'identifier le prélèvement et de proposer une 1ere partie chirurgicale.
- **Pièce opératoire** c'est ce que le chirurgien enlève de l'os, du cerveau... C'est en général des échantillons qui sont volumineux, qui nécessitent pour être analysés d'avoir des bases anatomiques
- **Autopsie** : utilisée de moins en moins souvent depuis la loi Cavaillet de 94. Maintenant l'autopsie devient une grande spécialité médico légale, l'anapath intervient en 2ème ligne pour analyser les échantillons prélevés par le légiste.

4 octobre 2011

La règle générale c'est que quand vous avez des ennuis la veille d'un acte technique un peu particulier, le plus simple c'est de passer un coup de fil au labo, de parler à l'anapath et on se met d'accord sur les conditions techniques d'acheminement du prélèvement, des fixateurs à utiliser, etc. A l'hôpital il y a sur le site internet une rubrique, "manuel de prélèvement", où vous allez pouvoir recueillir toutes les infos nécessaires à une technique correcte et propre. Quand vous serez installés vous aurez des contacts avec les labos qui vous transmettront un document qui s'appelle le manuel de prélèvement avec lequel vous serez capable de naviguer entre prélèvements.

Les liquides arrivent dans des containers ou dans des flacons qui sont stériles ; Les produits de ponction et les frottis arrivent sur lames.

## 1. TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENTS CELLULAIRES

### Le conditionnement

Il s'agit d'une étape importante car elle est là pour éviter que les cellules ne s'abîment, pour éviter l'autolyse. La **fixation** est un élément extrêmement important qui va bloquer l'autolyse, ce qui suppose de bloquer les processus de dégradation cellulaire.

#### Deux voies d'autolyse:

- Quand la cellule macrophagique craque, des enzymes sont larguées dans le milieu extracellulaire et détruisent tout l'environnement.
- L'autolyse bactérienne: la pullulation bactérienne entraîne une destruction des tissus. On le voit en post mortem.

De façon assez curieuse les acides nucléiques restent très longtemps exploitables (ADN, ARN). On est capable de faire des analyses ADN sur des produits pratiquement fossilisés.

#### Les étalements:

Realisés le plus fréquemment :

- Le **myélogramme** qui sert à analyser la moëlle osseuse. Utilisé quand il y a une perturbation de la numération de formule (cellules en trop ou en moins). Il nous donne des informations sur la maturation des cellules. Un certain nombre de maladies bloquent la maturation des cellules. Le myélogramme se fait par un trocart dans le sternum, une aspiration de moëlle, une projection fibroventriculaire sur la lame et un étalement. Ce qu'il faut faire c'est bien étaler et bien sécher les lames. C'est assez stable uniquement avec le séchage. Ça permet de faire un certain nombre de techniques ensuite, en particulier la **coloration de MCG (May-Grunwald- Giemsa)** qui colore en bleu > cette technique est surtout utilisée en **hémato** et pour les **ponctions d'organe profond**.
- En neuro (**SNC** essentiellement) il y a des **biopsies stéréotaxiques** avec une image en 3D de la lésion. Compte tenu de la graisse contenue dans le tissu nerveux il faut le fixer dans de l'**alcool absolu**.
- Pour les **frottis cervico utérins/vaginaux** vous pouvez utiliser des fixateurs prêts à l'emploi ou dans un mélange à 50% d'éther et d'alcool.

*Si un jour vous êtes dans l'arrière pays et que vous avez un papi qui vient vous voir avec de l'hématurie il est simple de faire une cytologie urinaire ; vous allez le fixer dans un tube d'alcool à 50° volume/volume.*

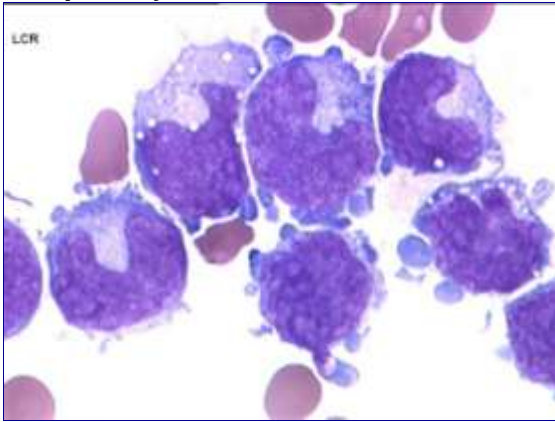
4 octobre 2011

Pour les liquides c'est un petit peu compliqué (pour la plèvre, le LCR...) il faut les transmettre à l'état frais (moins de 15mn) sinon les transférer dans de la glace de façon à ce que l'autolyse soit freinée (~4°C).

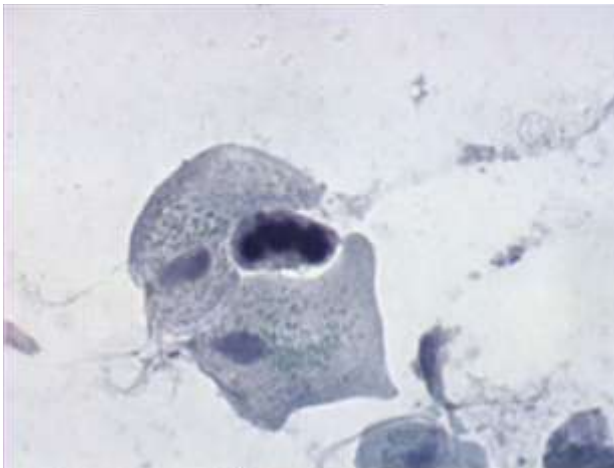
La **cytologie** est une technique rapide : arrivées au labo, en une heure on a des préparations qui sont sous microscope. Ce sont des infos qui sont très précieuses avec des fiabilités variables ( 100% en hémato sur la moelle, 100% sur SN central, moins fiable sur l'étiologie d'un épanchement pleural avec une sensibilité qui baisse à moins de 80% sur les acides (?)). Mais ça reste un outil d'orientation car on peut la coupler avec d'autres examens comme la bactériologie.

Pour les liquides on les centrifuge dans des **cytocentrifugeuses** qui permettent de recueillir les cellules, et ensuite de les préparer sous la forme d'un spot monocellulaire qui donne une très bonne visibilité des éléments cellulaires.

*Exemples : Il ya une coloration rose, c'est du cerveau.*



*Sur ce type d'image on reconnaît une prolifération tumorale, ce qui est étonnant dans le cerveau ce sont les structures allongées qui correspondent aux neo vaisseaux. Un cancer du cerveau s'accompagne toujours d'une importante néo vascularisation visible sur nos préparations mais aussi exploitée par les radiologues par hypervascularisation et par la prise de contraste sur le scanner avec injection ou l'IRM.*



*Frottis cervico utérin avec un trichomonas qui déclenche un purpura féroce.*

### Colorations cytologiques

- May-Grunswald-Giemsa (MGG)
- Papanicolaou
- Hématoxyline Eosine (HE)

4 octobre 2011

## EXEMPLE DU LIQUIDE PLEURAL

### Cellularité normale

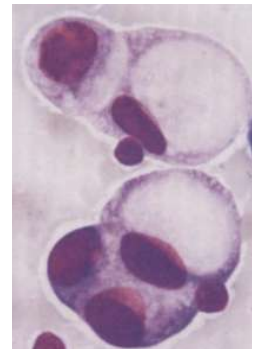
- **Cellules mésothéliales** qui vont souvent se grouper en placard, assez caractéristiques avec une condensation du cytoplasme bleu en périphérie. En fonction de leur excitation elles peuvent avoir une morphologie variable, peuvent contenir plusieurs choses. *Dans la plèvre elles servent d'éboueurs, elles vont sécréter un peu de liquide pour permettre le fonctionnement de la cage thoracique et vont résorber ce qu'il y a dans l'organisme.* Quand il y a une hémorragie il y aura du sang dans la cellule méso, si il y a de la poussière il y en aura dans la cellule méso. En fonction de l'âge du patient, de ses conditions d'exposition, de ses antécédents, on va retrouver dans son thorax des éléments tout à fait variables dans ses cellules meso.
- **Cellules inflammatoires** qui sont peu nombreuses mais assez polymorphes avec des macrophages, des lymphocytes, etc. Et éventuellement des polynucléaires. *Ex : On va retrouver ces éléments avec ce macrophage volumineux (comparé à l'hématie) au cytoplasme un peu gris, hétérogène.*

Notre problème, quand on nous envoie des liquides pleuraux, c'est de récupérer des cellules tumorales pour faire des diagnostics d'extension métastatique, ou de cancer primitif.

Le cancer primitif de la plèvre : la cellule s'appelle mésothéliale, le cancer s'appelle donc mésothéliome. Il est dû à l'amiante. Il y a 2000 cas par an. On connaît le rôle agressif de l'amiante depuis 1906 mais il est interdit en France seulement depuis 1998. Professions exposées : bâtiment, mineurs, travailleurs dans les usines de production, dans les bateaux ... et tout leur environnement! *Maladie de l'amiante : asbestose, calcification de la plèvre et développement du mésothéliome pour lequel il n'y a aucun traitement. La plèvre est le site de nombreuses invasions:*

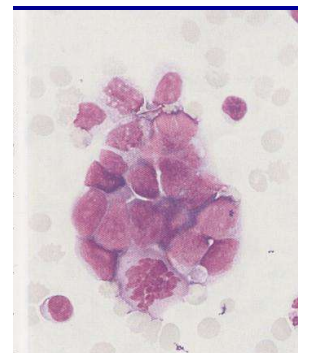
- **Invasions directes** : cancer du poumon qui va attaquer la plèvre et donner un épanchement
- **Extensions secondaires** : épanchement lymphatique et on observe des lymphangites sous pleurales

Les cellules tumorales (adénocarcinome) dans le liquide pleural se repèrent facilement avec leur grosse vacuole qui donne la forme d'une bague à chaton (cf. photo ci-contre).



Les cancers bronchopulmonaires se répartissent en 2 catégories :

- **A petites cellules** (cf. photo ci-contre) :
  - × progression très rapide,
  - × temps de doublement tumoral de 2 à 3 semaines,
  - × Noyau petit,
  - × Les cellules se regroupent en formant des paquets où les noyaux se superposent, on parle d'aspect tridimensionnel.
- **Non à petites cellules** :
  - × temps de doublement tumoral de plusieurs mois.
  - × Ces cancers sont très sensibles à la chimiothérapie.



4 octobre 2011

Le **lymphome** est une prolifération de lymphocytes tumoraux.

Le **mésothéliome** (très méchant) forme un gros paquet de cellules en 3D qui se superposent, le rapport nucléocytoplasmique est très élevé, il y a de très gros noyaux avec une boule noire constante parfois dédoublée qui correspond au nucléole. A ce moment là, on a tous les signes de malignité.

La cytose marche bien, ne coûte pas cher (20centimes), et est intéressante pour le diagnostic.

## 2. MÉTHODES D'EXPLORATIONS TISSULAIRES

### Différents types de prélèvements:

- **Biopsie expérimentale** (1 à 2 mm<sup>3</sup>)
- **Biopsie exérèse**
- **Pièce opératoire** (1 a 2 kg)

### Étude macroscopique:

- 1ère étape indispensable pour les pièces opératoires,
- Pendant les heures ouvrables, on préfère recevoir la pièce à l'état frais (apportée par le personnel du bloc dans les 10, 15mn), la nuit la pièce devra être fixée dans le formol pour éviter l'autolyse.
- la pièce est décrite, examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée. On recherche des lésions secondaires et des paramètres pronostiques.

### Exemples:

#### → **Pièce d'oesogastrectomie pour cancer:**

Ce type de chirurgie est réalisé sur les tumeurs de la partie inférieure de l'œsophage ou du cardia.

- **Sémiologie possible:** obstruction de l'œsophage provoquant des difficultés pour avaler (dysphagie)
- **1<sup>er</sup> signe:** impression d'accrochage lors du passage de solides qui peut évoluer en dysphagie aux liquides pour les tumeurs les plus évoluées.
- Au niveau de l'oesophage il existe deux groupes de cancers:
  - × **Malpighiens:** tiers moyen et supérieur de l'œsophage, risques liés au tabac associé à l'alcool, aux agressions par le chaud (thé) et à quelques virus
  - × **Glandulaires:** au niveau du bas de l'œsophage et du cardia.



**Facteurs de risque:** reflux oesogastriques (ROG). Lors d'un diagnostic de ROG, une surveillance endoscopique précise est mise en place pour permettre la détection précoces des lésions afin d'éviter ce type de problèmes.

Lorsque que la réception de la pièce se fait à l'état frais, des prélèvements sont possibles pour la recherche moléculaire par exemple. Ceci est important par la suite, pour la prise en charge du patient et le choix du traitement.

4 octobre 2011

La lésion est ensuite décrite: on observe ici une tumeur volumineuse, les bords sont en relief et le fond est creux → il s'agit d'une **tumeur ulcéro- bourgeonnante**.

Puis on réalise des coupes tous les 2mm et des prélèvements sur la lésion pour déterminer le niveau d'invasion. Une musculature totalement atteinte annonce un mauvais pronostic.

Lorsque l'on retourne la pièce on observe un petit lambeau dans lequel se trouvent les ganglions que l'on va prélever.

Après 48h la pièce est fixée dans **formol**. Le formol ou **formaldéhyde à 40%** est un excellent fixateur classé en **CMR (cancerigen mutagen reproduction)** par l'OMS depuis 2005.

Il est utilisé, dilué au dixième (4%), dans les laboratoires d'anapath sur des postes de travail ventilés. La fixation au formol entraîne une modification de la couleur (rouge → gris) et de la consistance (tissu durcit). Si on préfère travailler en frais le formol garantit une excellente désinfection de la pièce. Il est encore aujourd'hui utilisé pour la désinfection des blocs opératoires et des unités protégées des bateaux et est le seul capable de détruire certains champignons comme l'aspergillus. Enfin c'est un allergène puissant à l'odeur caractéristique.

#### → **Pièce de prostactéomie:**

\* **Symptomatologie:** l'adénome prostatique entraîne des troubles mictionnels, en effet l'augmentation de la taille de la prostate va entraîner une compression de la vessie qui va diminuer sa contenance et la pression lors de la miction (« il va pisser plus souvent et moins loin »).

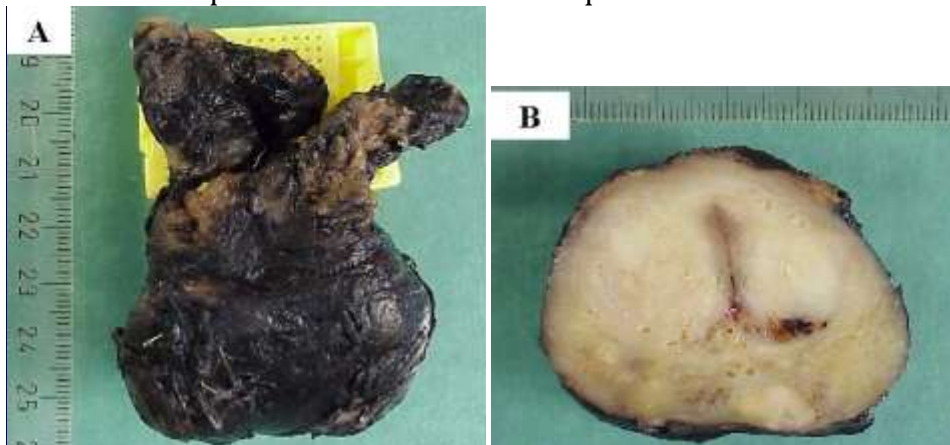
Par ailleurs il existe une loi en médecine: un obstacle sur un tuyaux révèle très souvent une infection en amont. Il faut donc regarder s'il n'y a pas d'épisode d'infection urinaire (pareil pour cancer de la vessie).

\* Il existe deux grands groupes de pathologies pour la prostate: les **adénomes** et le **cancer**.

- L'**adénome** touche la prostate transitionnelle autour de l'urètre et va donc entraîner des troubles de la miction.
- Le **cancer** touche la prostate périphérique et ne va donc pas provoquer de troubles fonctionnel, il va se manifester par des métastases principalement osseuses (10 -15% des diagnostics). L'observation de vertèbre couleur ivoire chez un homme âgé conduit au dosage de la PSA et à un examen de la prostate. Sa localisation périphérique explique qu'on va le sentir au toucher rectal.

L'ablation de la prostate ne se fait que dans le cas de petits cancers.

Suite à une prostatectomie la pièce d'exérèse est colorée à l'encre de chine puis on réalise des coupes que l'on observe au microscope. On retrouve la coloration en périphérie ce qui permet de garantir au chirurgien que la totalité de la prostate a été retirée ainsi que la tumeur.



4 octobre 2011

En effet, on voit que la marque d'exérèse, en noir (encre) passe bien au delà de la lésion. Sur la coupe on voit également l'urètre et le vérémontanum, là où se jettent les gros canaux de la prostate dans l'urètre. Il s'agit d'un repère inférieur très important pour l'urologue, en effet, s'il coupe plus bas il risque de léser le plancher pelvien et rendre le malade incontinent. On sait qu'on est à la zone médiane de la prostate. La Zone périphérique est jaunâtre, en blanc on voit l'adénome qui comprime l'urètre du malade qui présente des troubles de la miction. On observe également un autre nodule blanc: le cancer. Chez ce malade on a donc retiré la prostate pour une lésion d'environ 10mm mais on l'a guérit (marque d'exérèse bien au delà de la lésion).

La Qualité de la préparation nécessite de bien repérer la lésion et d'être extrêmement soigneux pendant la dissection: ne pas faire de plaie quand on fait la dissection car il faut pouvoir garantir au chirurgien la qualité de l'exérèse.

**Conclusion:** La macro permet de faire des prélèvements sur les lésions, sur les tissus sains et les éléments associés ainsi que des observations sur les limites chirurgicales afin de donner une réponse très importante au chirurgien: « *oui tu as tout enlevé ou non t'es passé dedans* ».

## LA FIXATION

Elle est indispensable pour conserver la morphologie des cellules.

- Si la fixation est mal faite: trop tardive, dans un produit dont la concentration n'est pas bonne, trop forte ou trop faible (il faut du formol à 10% ou formaldéhyde à 4%).
  - Si la quantité de formol est insuffisante (on considère qu'il faut dix fois le volume de la pièce)
- > on ne sera pas dans de bonnes conditions, en effet cela implique d'avoir des récipients suffisamment gros ( par ex. pour un foi de 4kg il faudrait 40 l). On préfère réaliser la dissection, le repérage de la lésion et le prélèvement à l'état frais, puis on va couper la pièce et la mettre dans trois ou quatre container. La dissection à l'état frais présente en plus du risque chimique un risque infectieux (hépatite).

## Types de fixateurs

- \* Le **formol** est le fixateur universel, on l'utilise dilué au 10e ce qui équivaut à une solution de formaldéhyde à 4% (formol = formaldéhyde à 40%)
- \* Le **liquide de Bouin** est un très bon fixateur morphologique mais détruit ADN et ARN,
- \* « *Les fixateurs alcooliques sont promis à un bel avenir, mais depuis 30ans on se demande si l'avenir n'est pas derrière eux* »,
- \* Le **paraformaldéhyde** est utilisé en pathologie expérimentale car c'est un bon produit pour conserver les antigènes, mais c'est un fixateur instable donc réservé à des scientifiques « purs et durs ».
- \* Le **glutaraldéhyde** est utilisé en microscopie électronique « *mais comme on en fait plus on s'en fout* »

### Quelques caractéristiques du formol:

- Cinétique de pénétration dans les tissus: environ 2mm/h (pour une grosse pièce opératoire, la pénétration prend plus d'une journée, pour une biopsie environ 12h),
- Pouvoir de pénétration variable selon les tissus, de 10 à 20mm.