

# TECHNIQUE

2<sup>e</sup> partie

# Techniques especiales

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

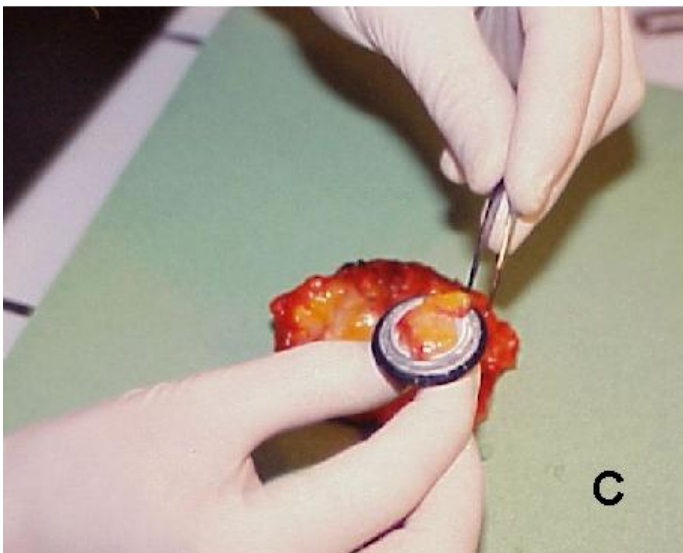
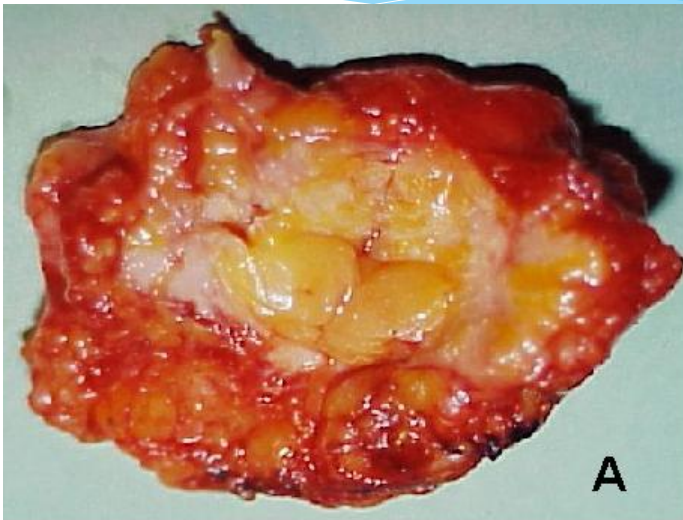
# Extemporané

- \* 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

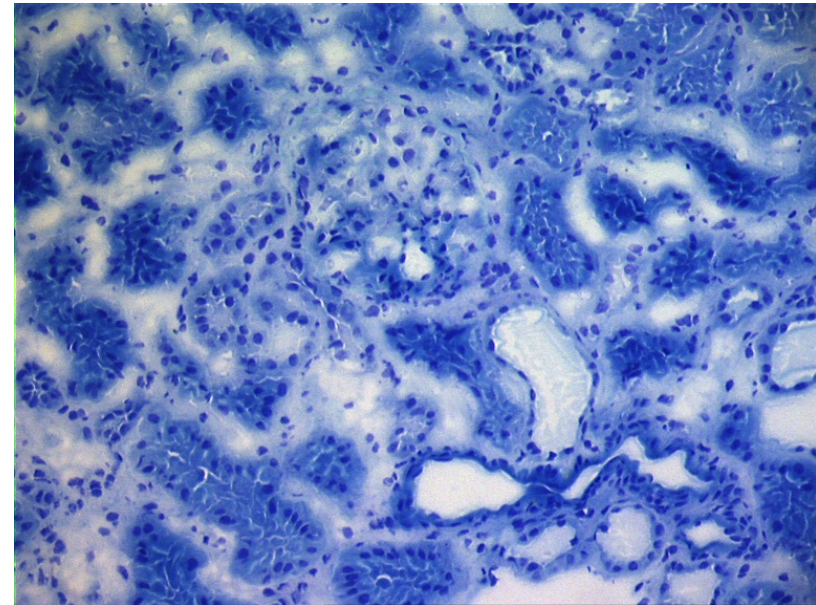
- \* **Objectifs :**
  - \* détermination de la nature de la lésion abordée chirurgicalement
  - \* évaluation des limites d'exérèse
  - \* évaluation de l'extension d'une tumeur : métastases ganglionnaires , hépatiques...
- \* **étude macroscopique + + +**
- \* **2 techniques :** coupe congelée (++) et cytologie

# Examen extemporané d'une tumorectomie mammaire



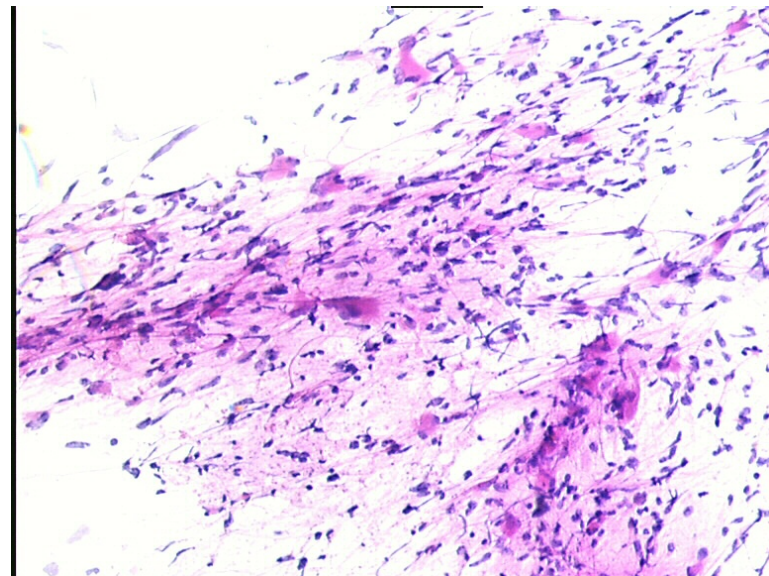
# Extemporané

- \* 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

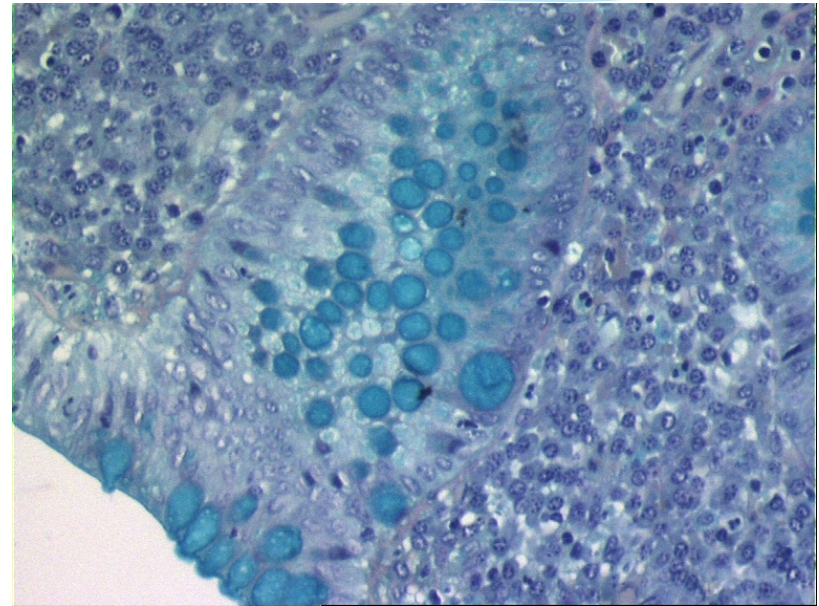
- \* Seul un nombre réduit d'échantillons peuvent être examinés par cette technique
- \* Moins bonne morphologie qu'en histologie conventionnelle
- \* L'examen extemporané est systématiquement contrôlé par un examen histologique standard, le fragment analysé étant fixé après décongélation
- \* Le résultat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

# HISTOCHIMIE

- \* **Colorations spéciales permettant :**
  - \* Etude des produits de secretion cellulaire
  - \* Etude de la matrice extra cellulaire et recherche de depots
  - \* Recherche de microorganismes
- \* **Lumiere blanche, polarisee ou uv**

# COLORATIONS SPECIALES

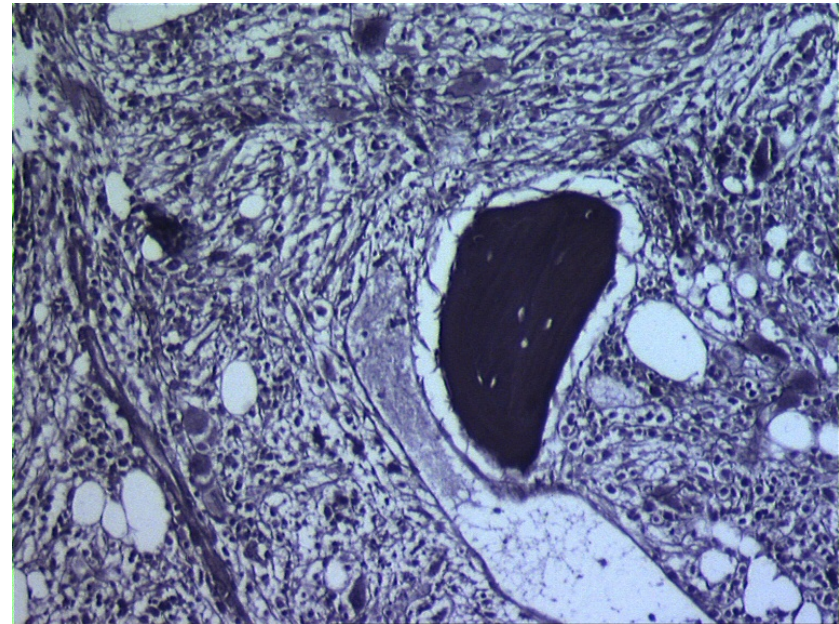
- \* **constituant intracellulaire anormal ou normal en excès**
- \* **ex :**
  - \* glycogène coloré par PAS, avec réaction diastase sensible ;
  - \* mucus, coloré par bleu alcian ou mucicarmin



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

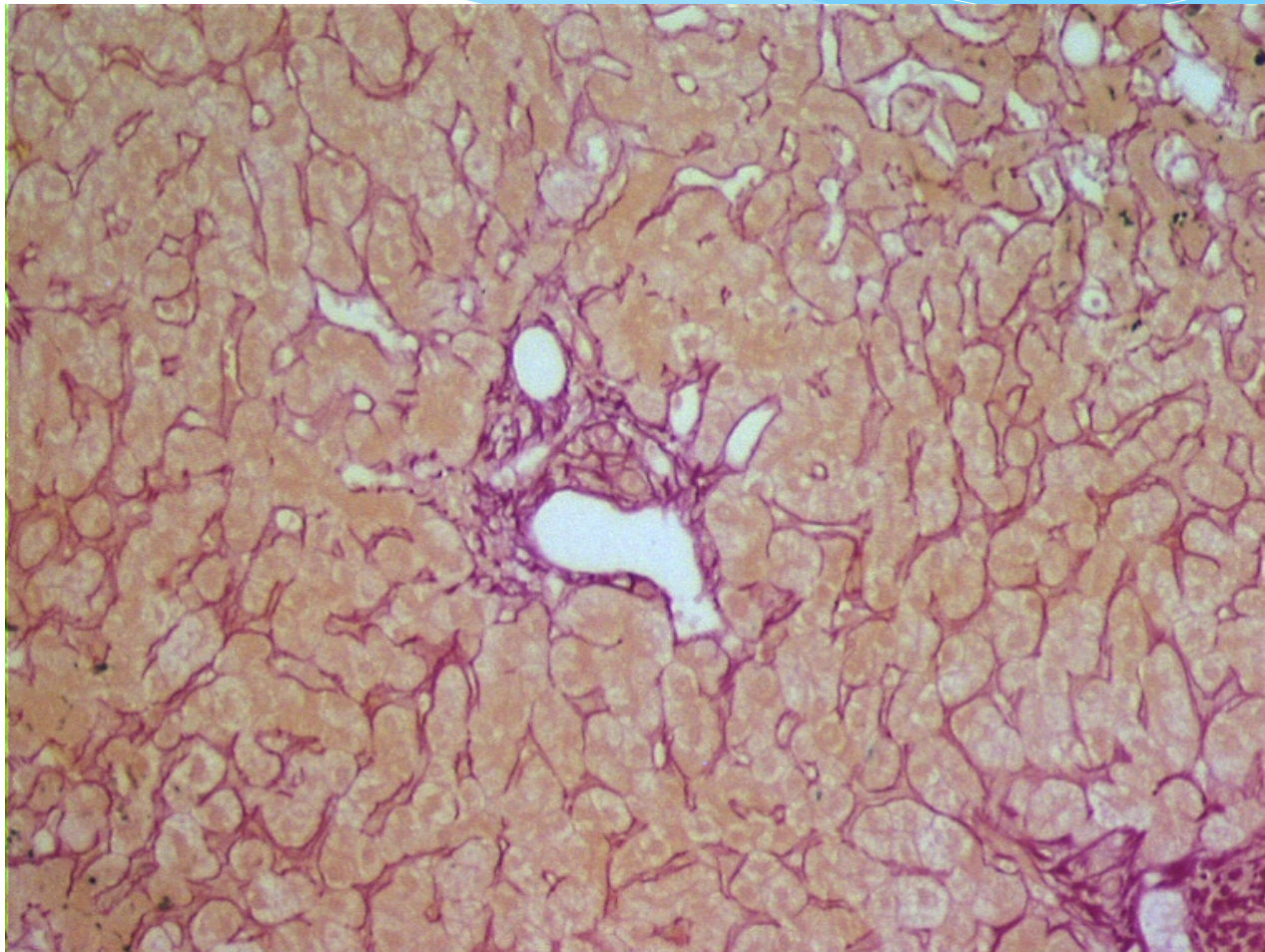
# COLORATIONS SPECIALES

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

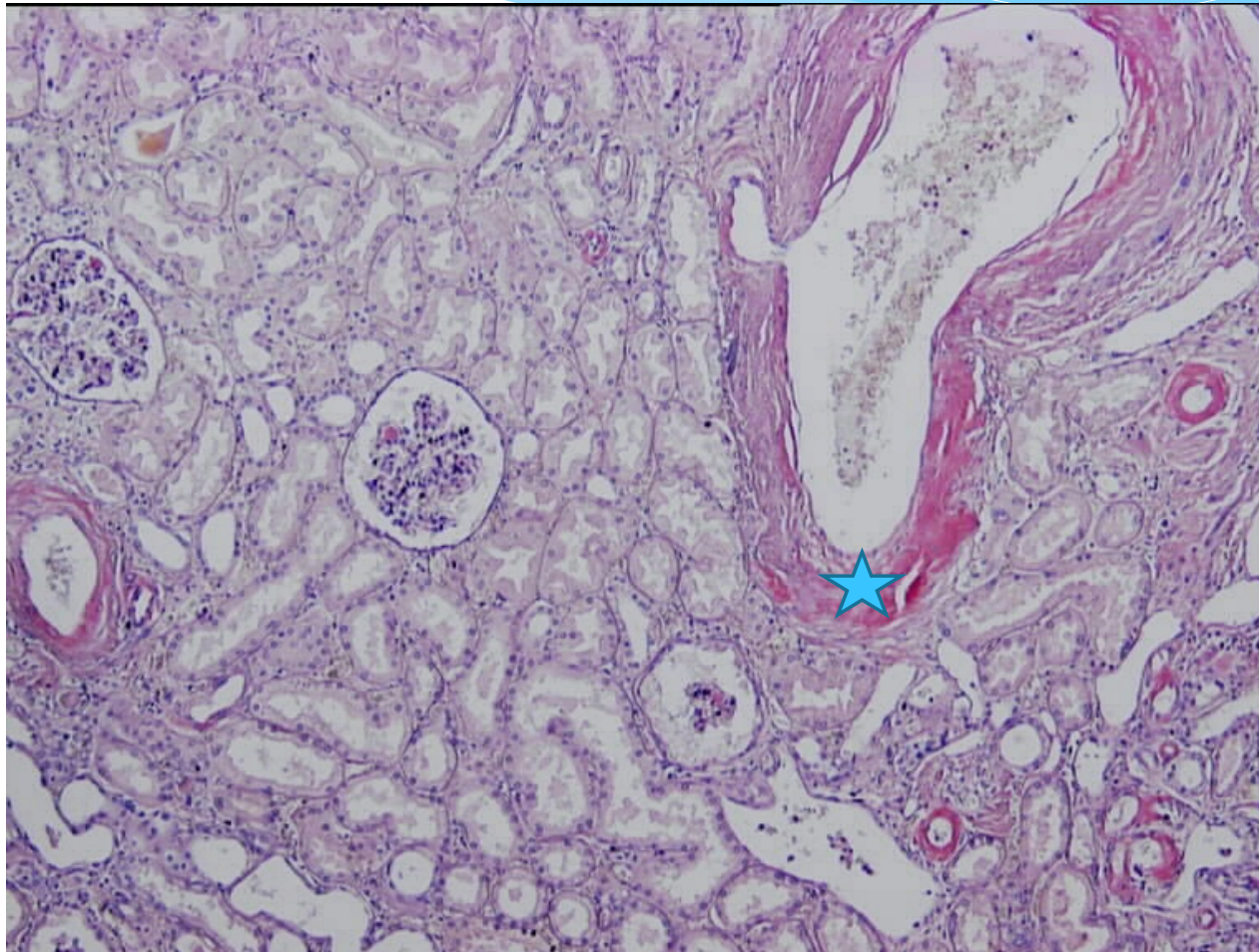


*Gordon : coloration de la réticuline en noir*

# ROUGE SIRIUS ET FIBROSE HEPATIQUE



# ROUGE CONGO / AMYLOSE

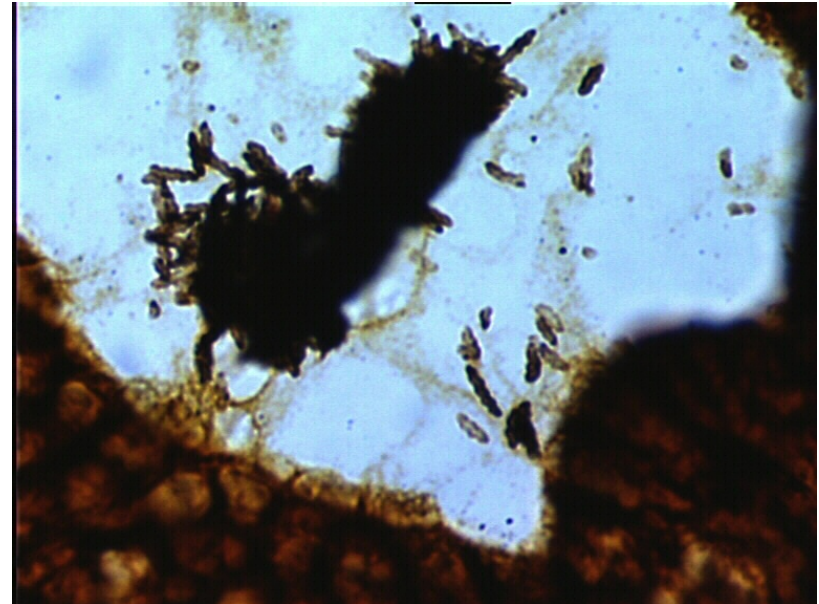


# COLORATIONS SPECIALES

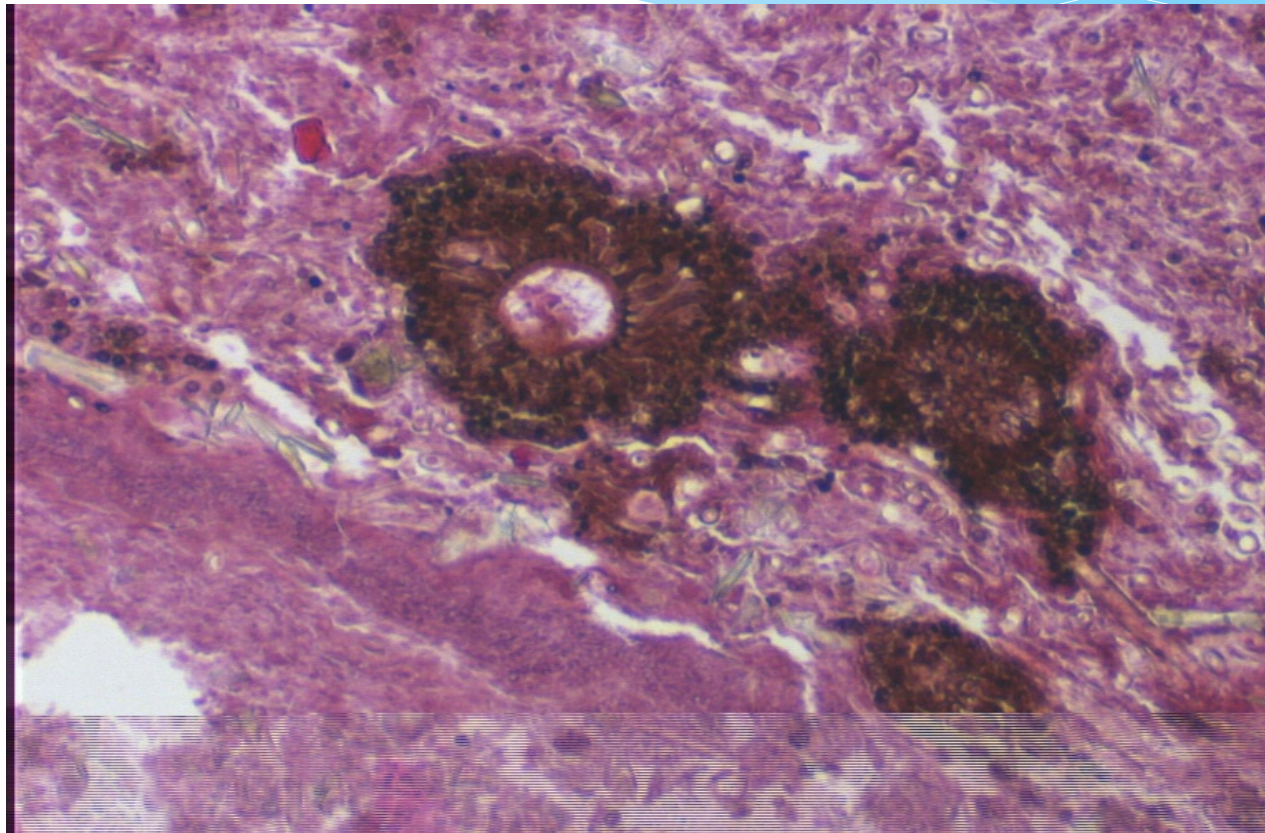
- \* organites intra-cytoplasmiques :
  - \* ex double striation des fibres musculaires lisses par hématoxyline phosphotungstique.

# 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

# Histoinmunologie

- \* 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.

# Histoinmunologie

- \* **Immunofluorescence :**

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

- \* **Immunohistochimie :**

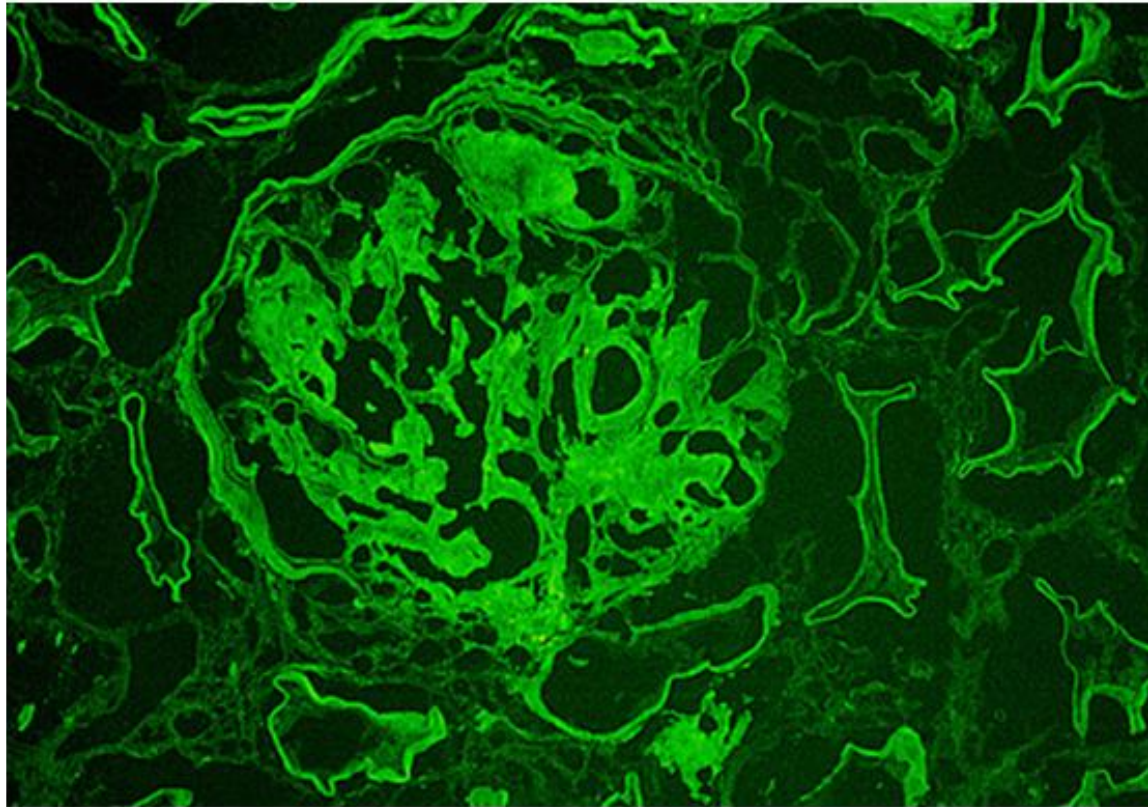
- \* anticorps couplé à une enzyme, sur coupe tissulaire
- \* Utilisation très large de l' IHC en pratique +++
- \* Méthode indirecte

- \* **Immunocytochimie :**

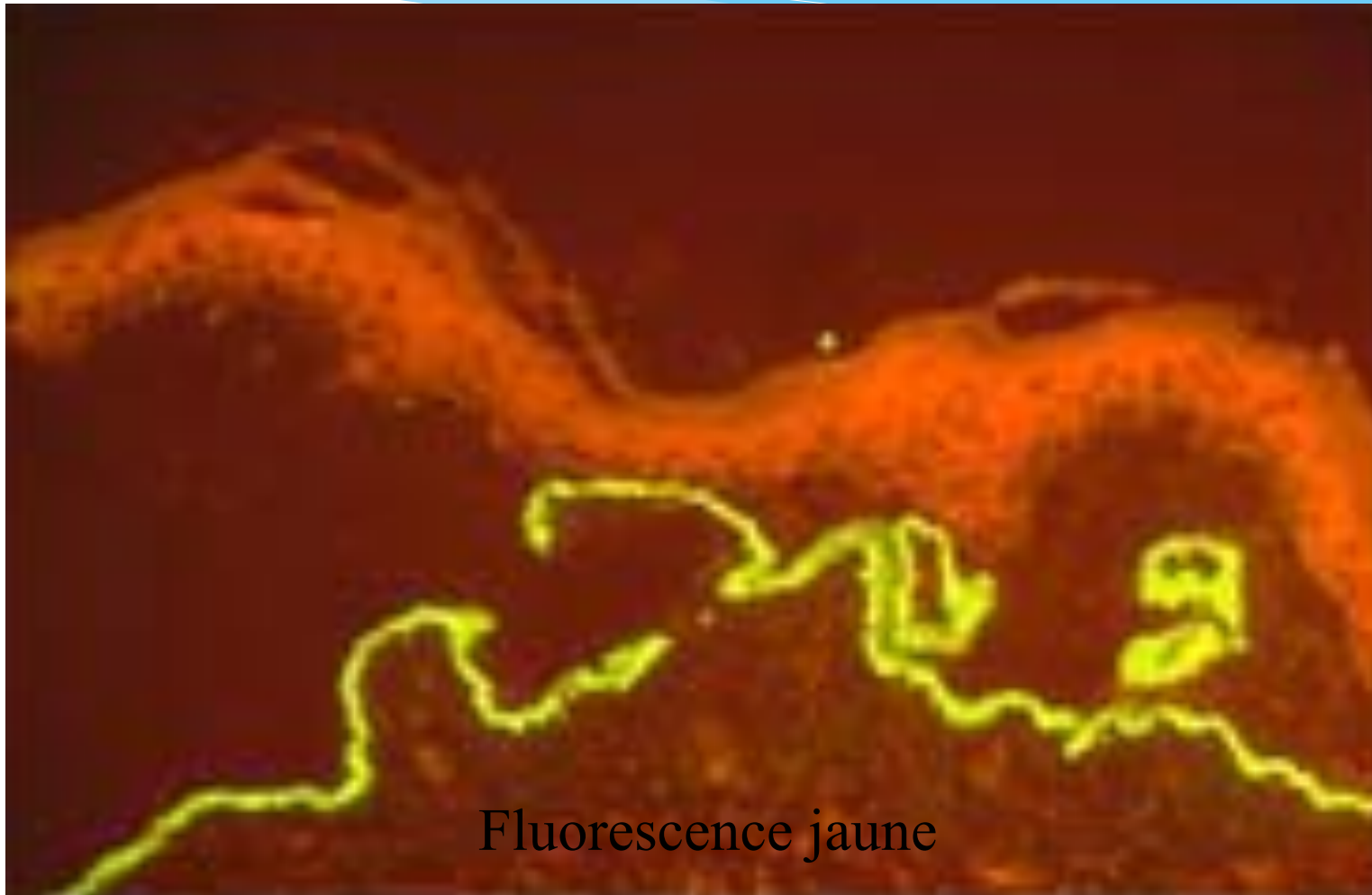
- \* anticorps couplé à une enzyme, sur prélèvement cytologique
- \* Méthode indirecte

*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)



# membrane basale de l'épiderme (immunofluorescence)



Fluorescence jaune

# Immunohistochimie

The image shows a histological section of breast tissue stained with immunohistochemistry. The cells are stained with a brown chromogen, highlighting the cell membranes. The nuclei are stained with a blue counterstain. The brown staining is localized to the cell membranes, indicating the presence of the c-erbB2 protein. The tissue shows a dense arrangement of cells with prominent nuclei and brown-stained membranes.

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

# Histoinmunologie

- \* 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 souvent nécessaire ( ex : typage lymphocytaire).

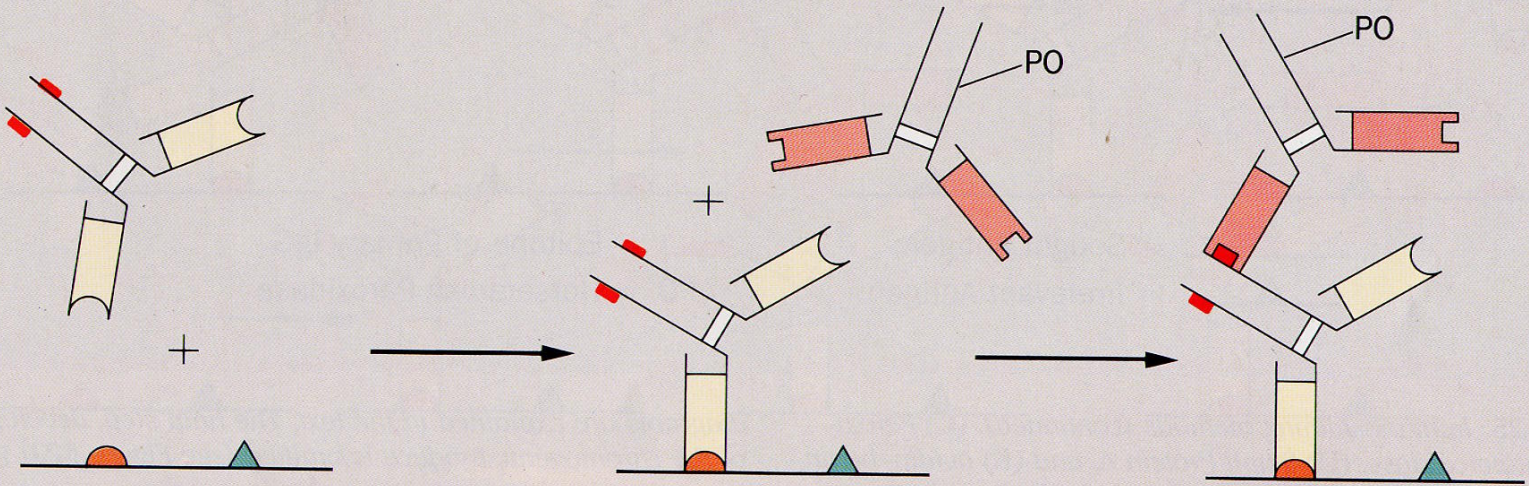
# Histoinmunologie


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

# Histoinmunologie

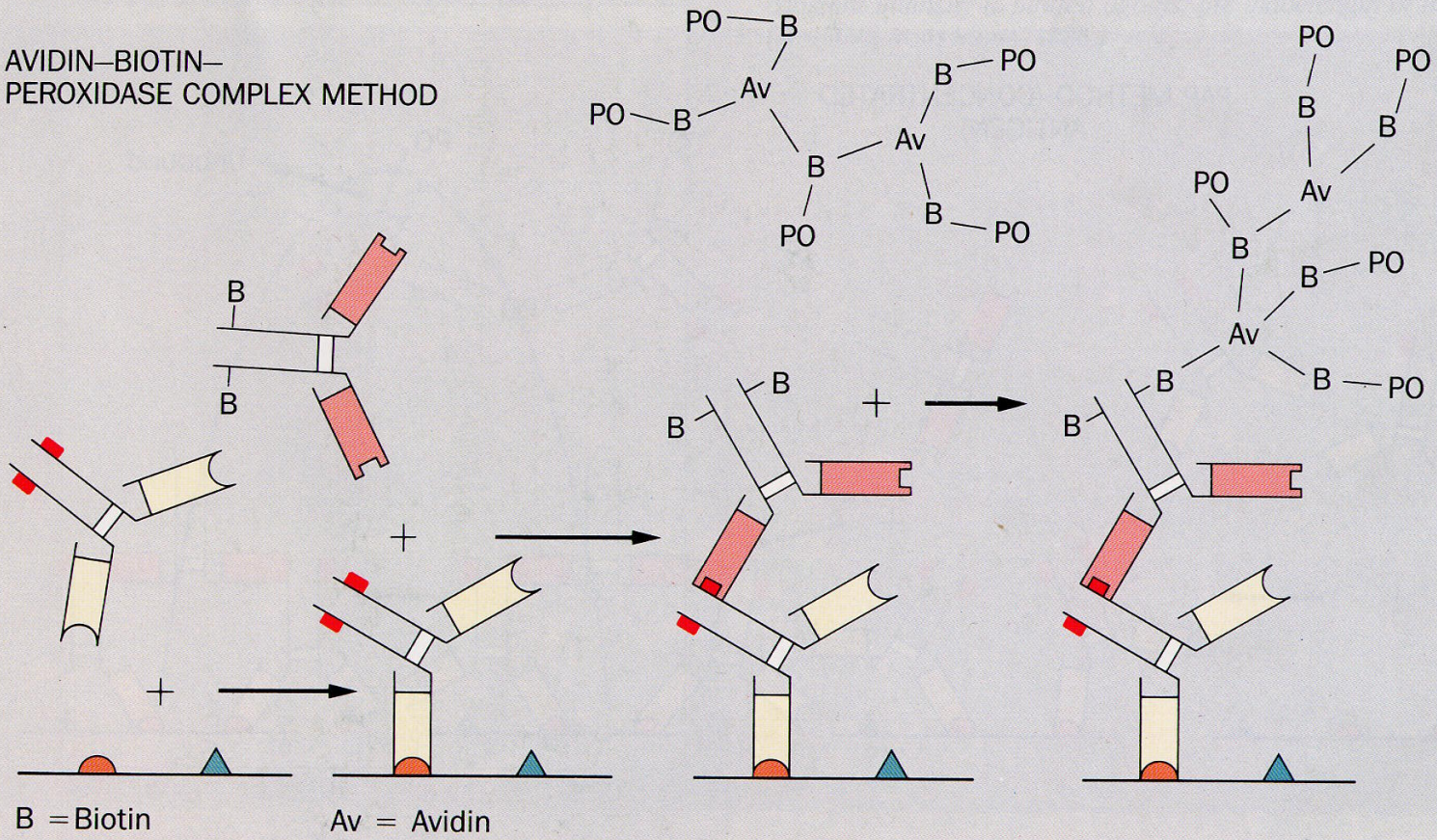
- \* Méthode :
  - \* les **méthodes indirectes** multicouches, en utilisant un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris, associé à un complexe de révélation portant plusieurs molécules de chromogène, permettant une amplification du signal.
  - \* résultat à comparer avec un témoin négatif et un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

INDIRECT IMMUNOPEROXIDASE METHOD



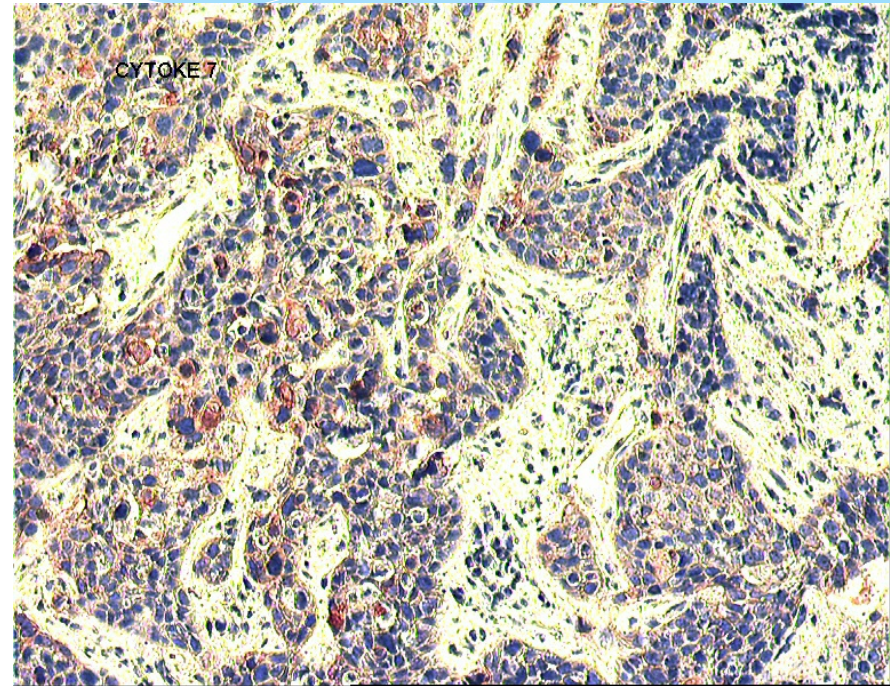
 = Epitope Of Primary IgG      PO = Horseradish Peroxidase

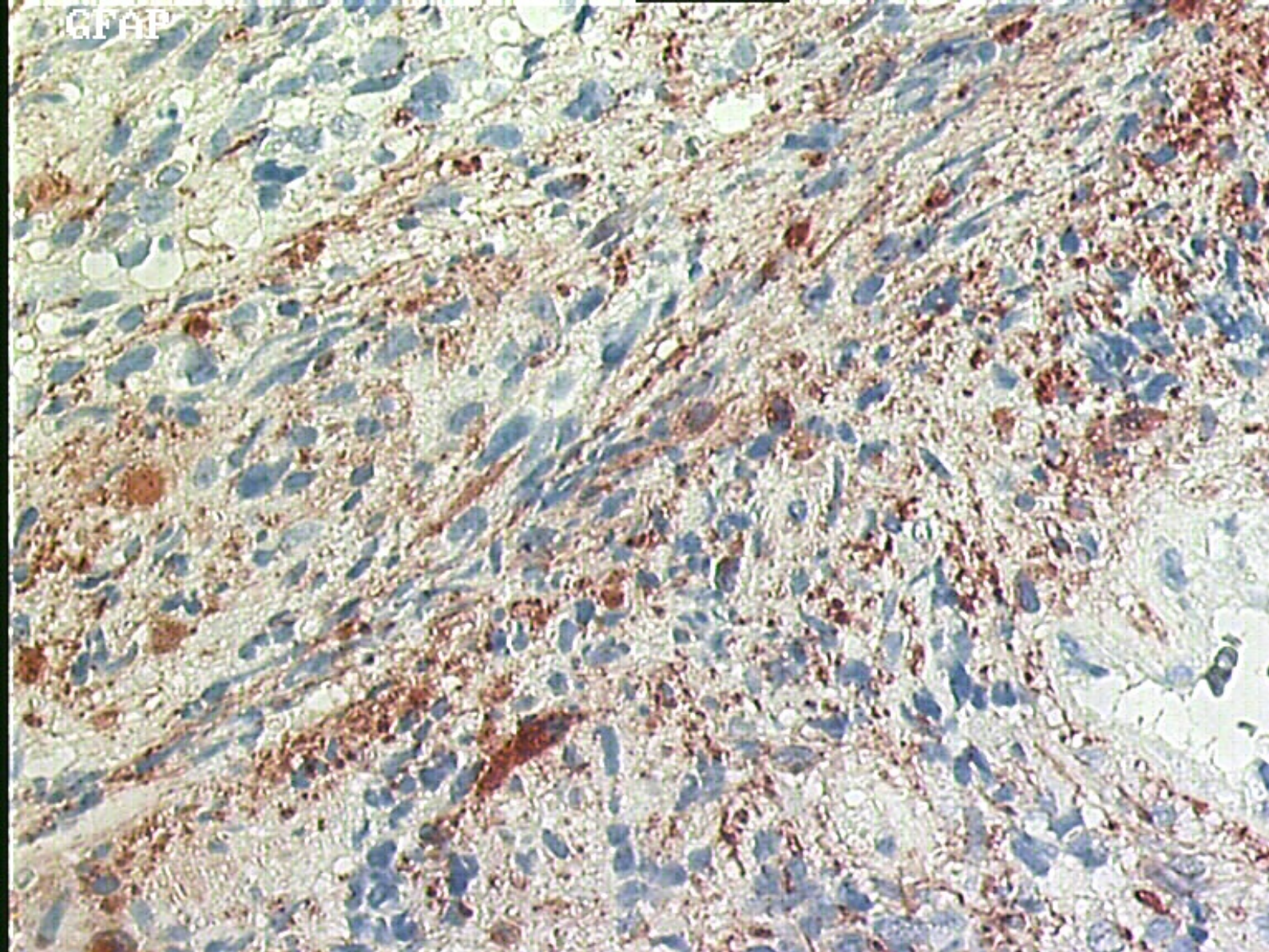
AVIDIN-BIOTIN-  
PEROXIDASE COMPLEX METHOD



# Histoimmunologie

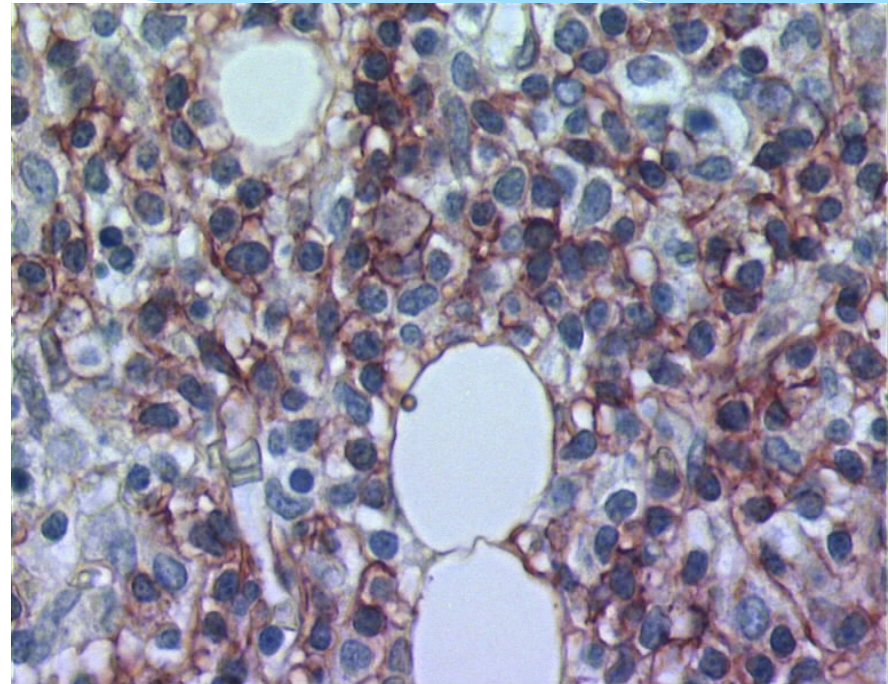
- \* Antigènes du cytosquelette :
  - \* filaments de cytokeratine retrouvés dans les tumeurs malignes épithéliales;
  - \* filaments de desmines dans les tumeurs musculaires





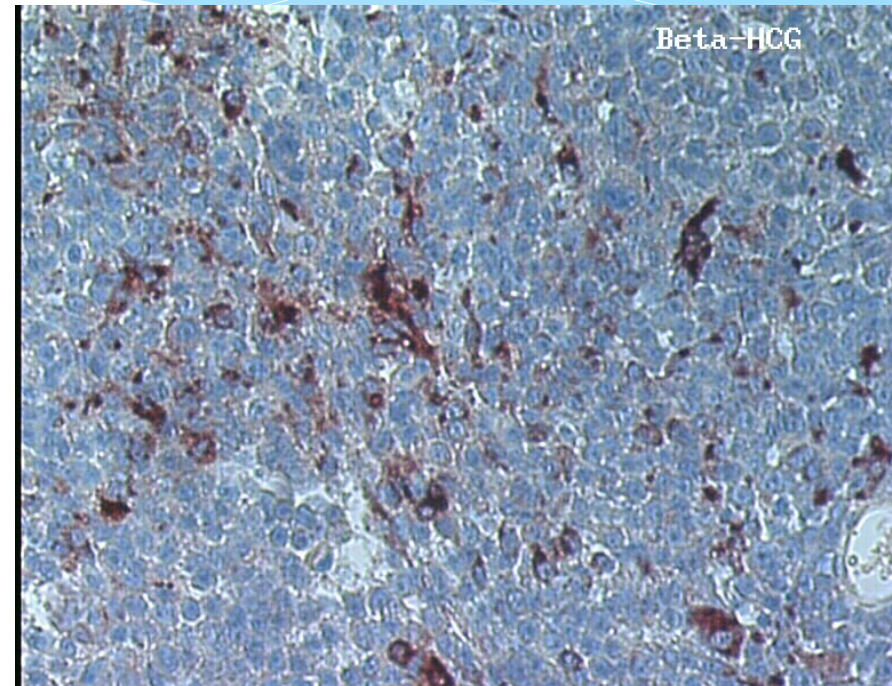
# Histoimmunologie

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



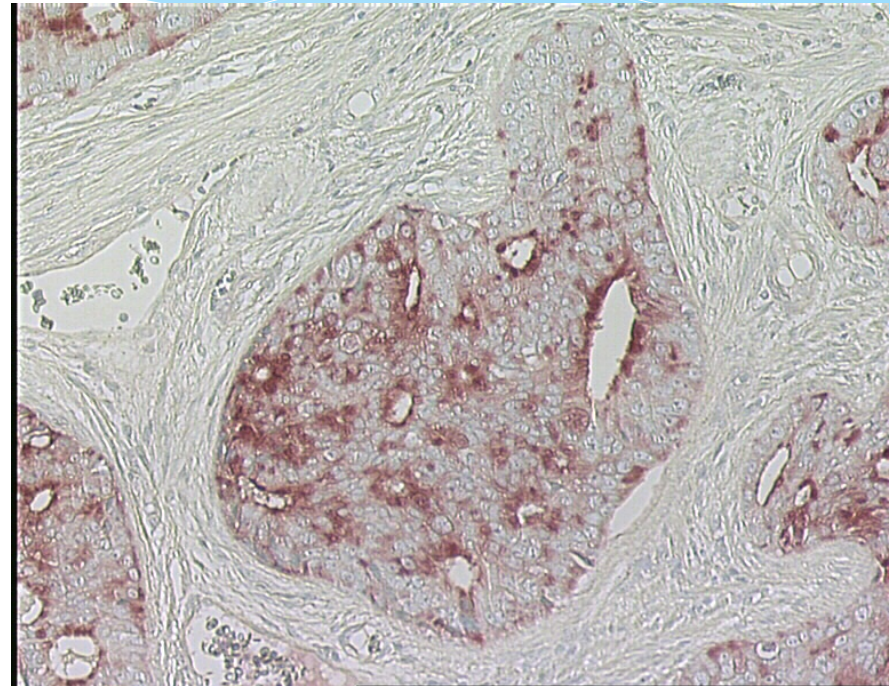
# Histoimmunologie

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



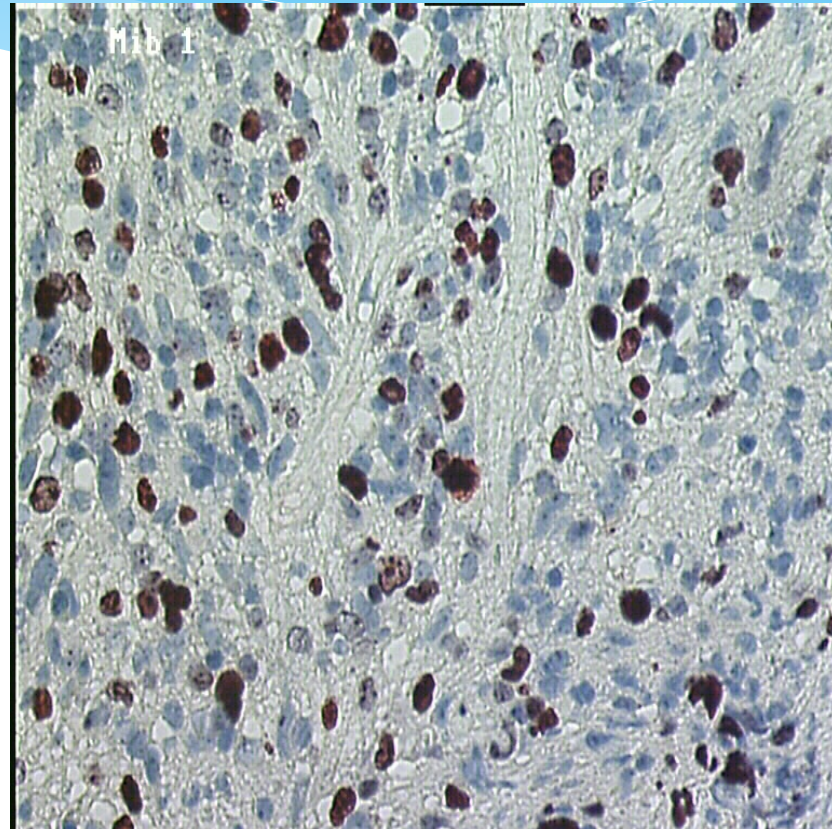
# Histoimmunologie

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



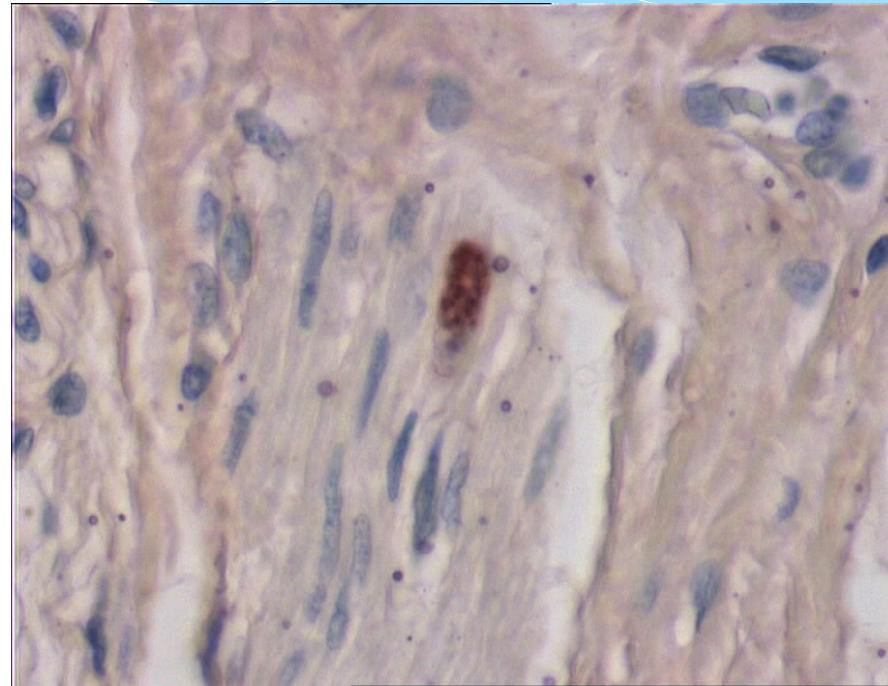
# Histoimmunologie

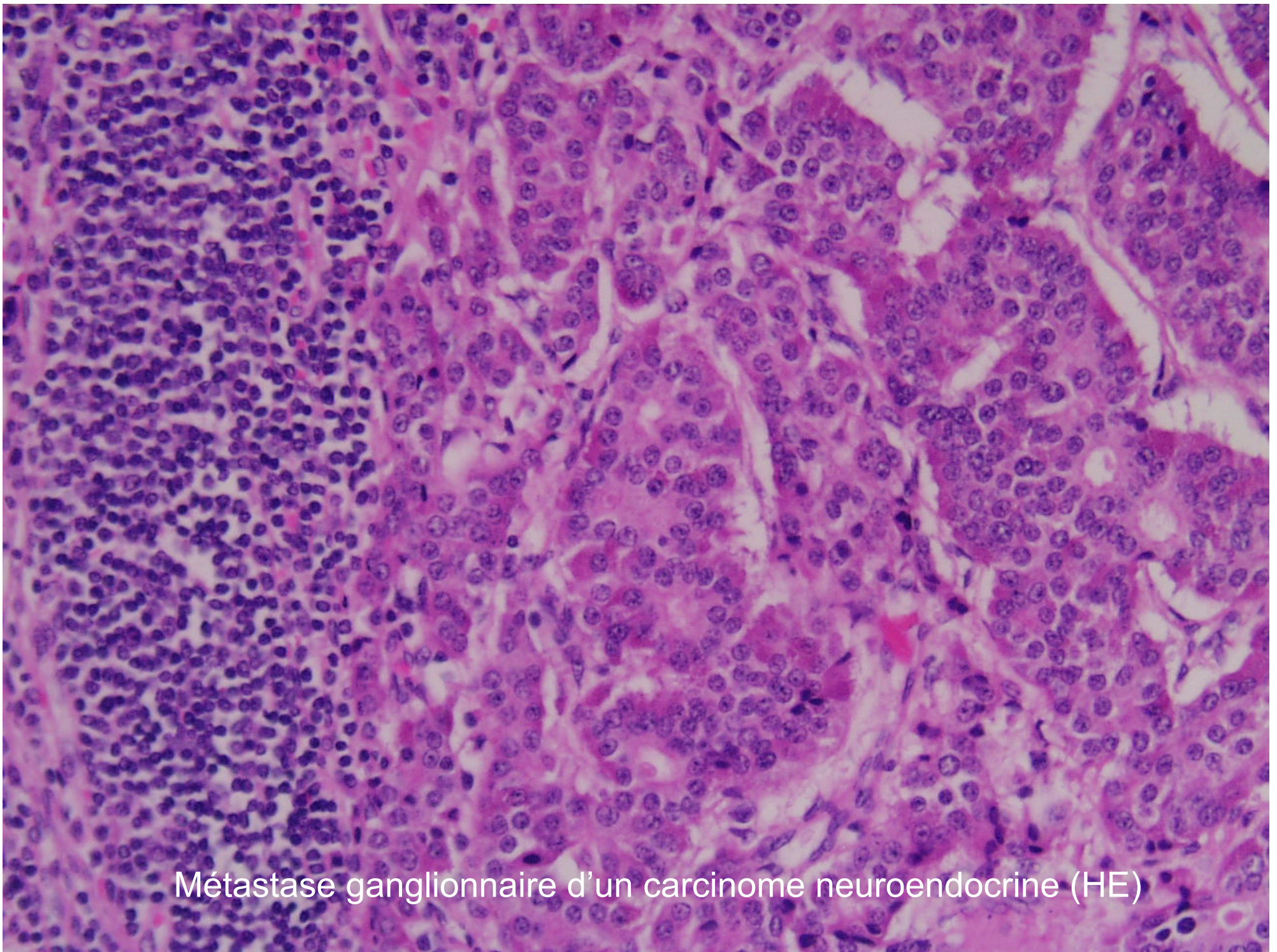
- \* Protéines du cycle cellulaire et apoptose
  - \* Ex : Mib1(marqueur de prolifération)
- \* Récepteurs hormonaux
  - \* Ex : RO et RP



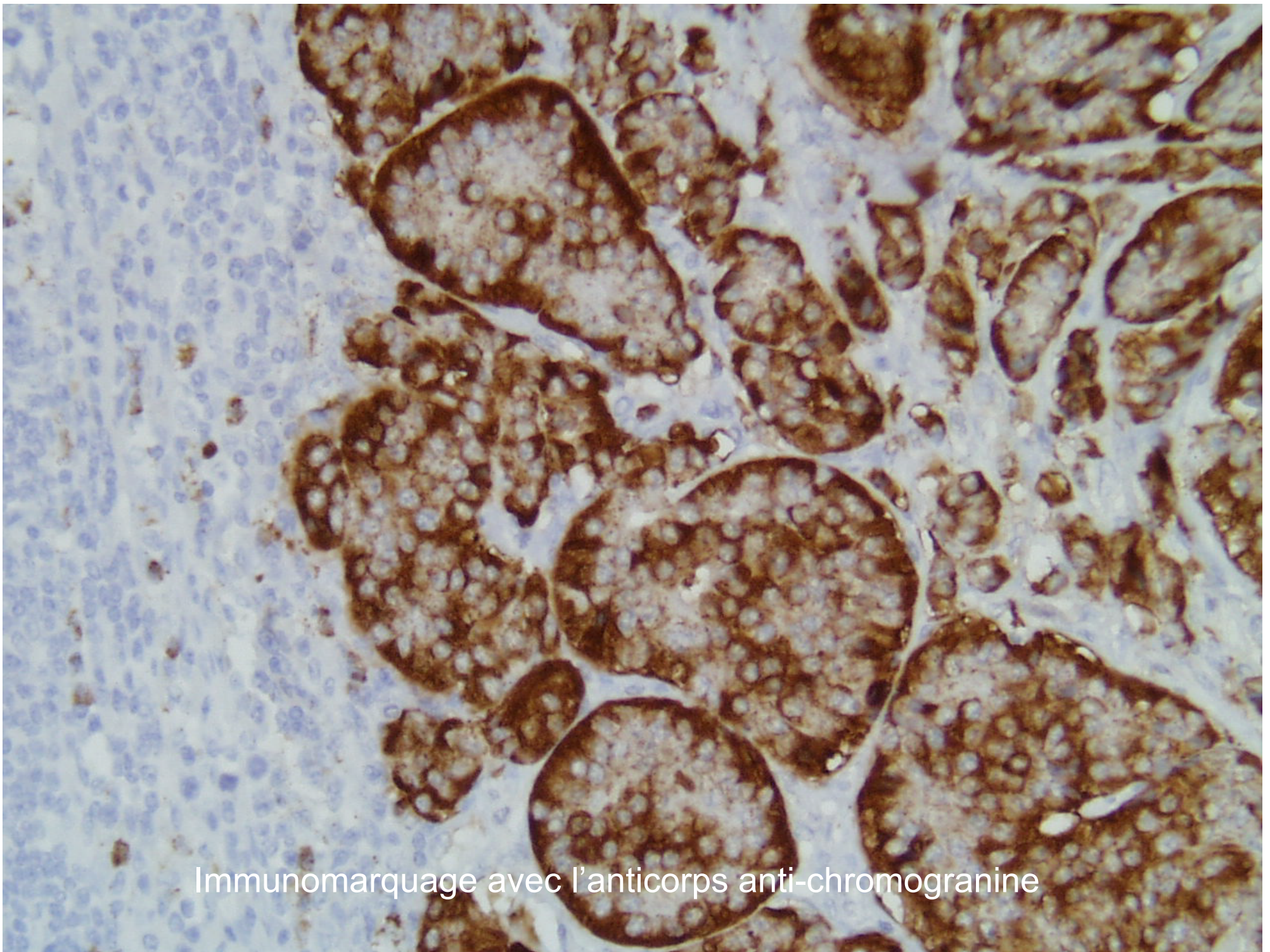
# Histoimmunologie

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

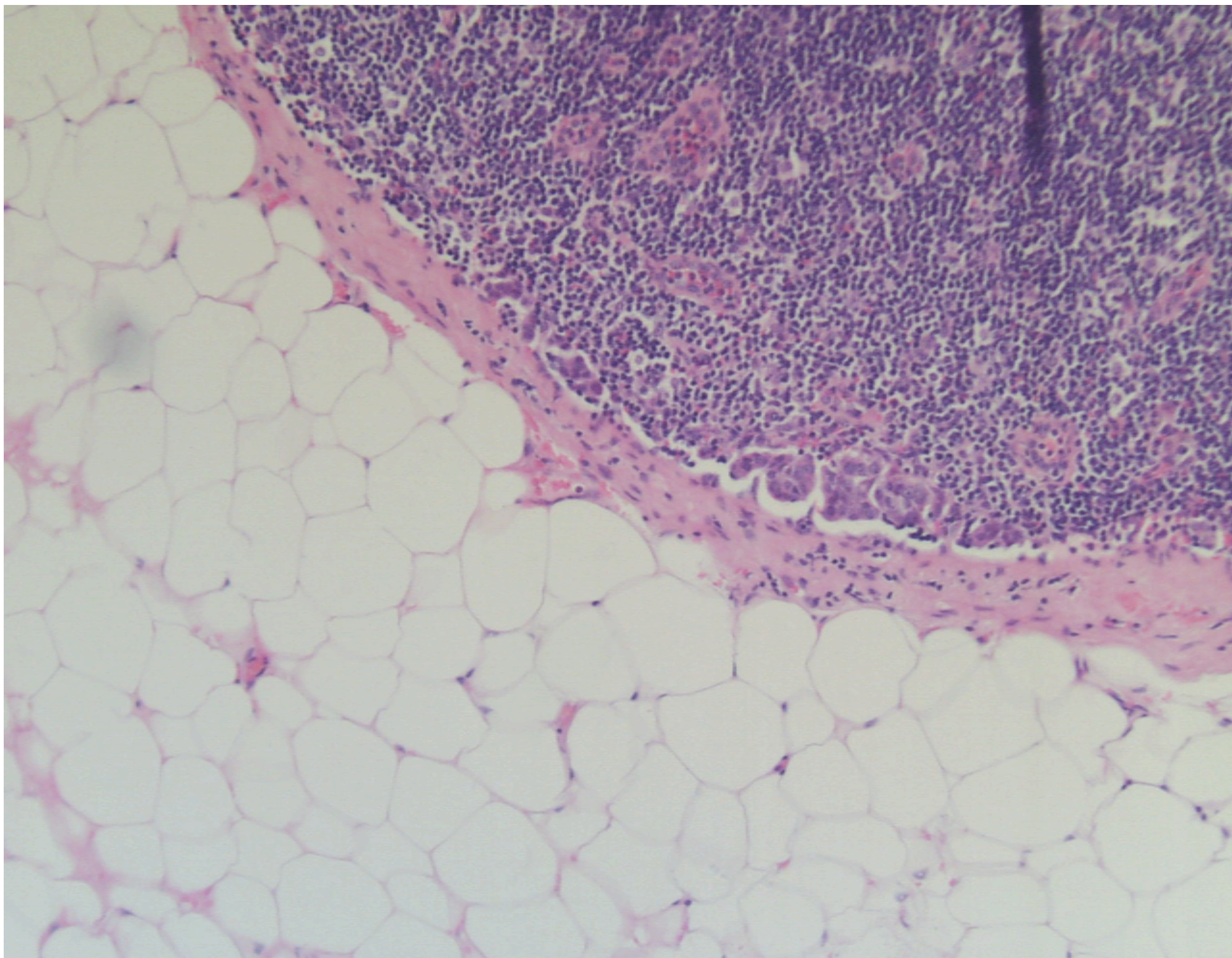


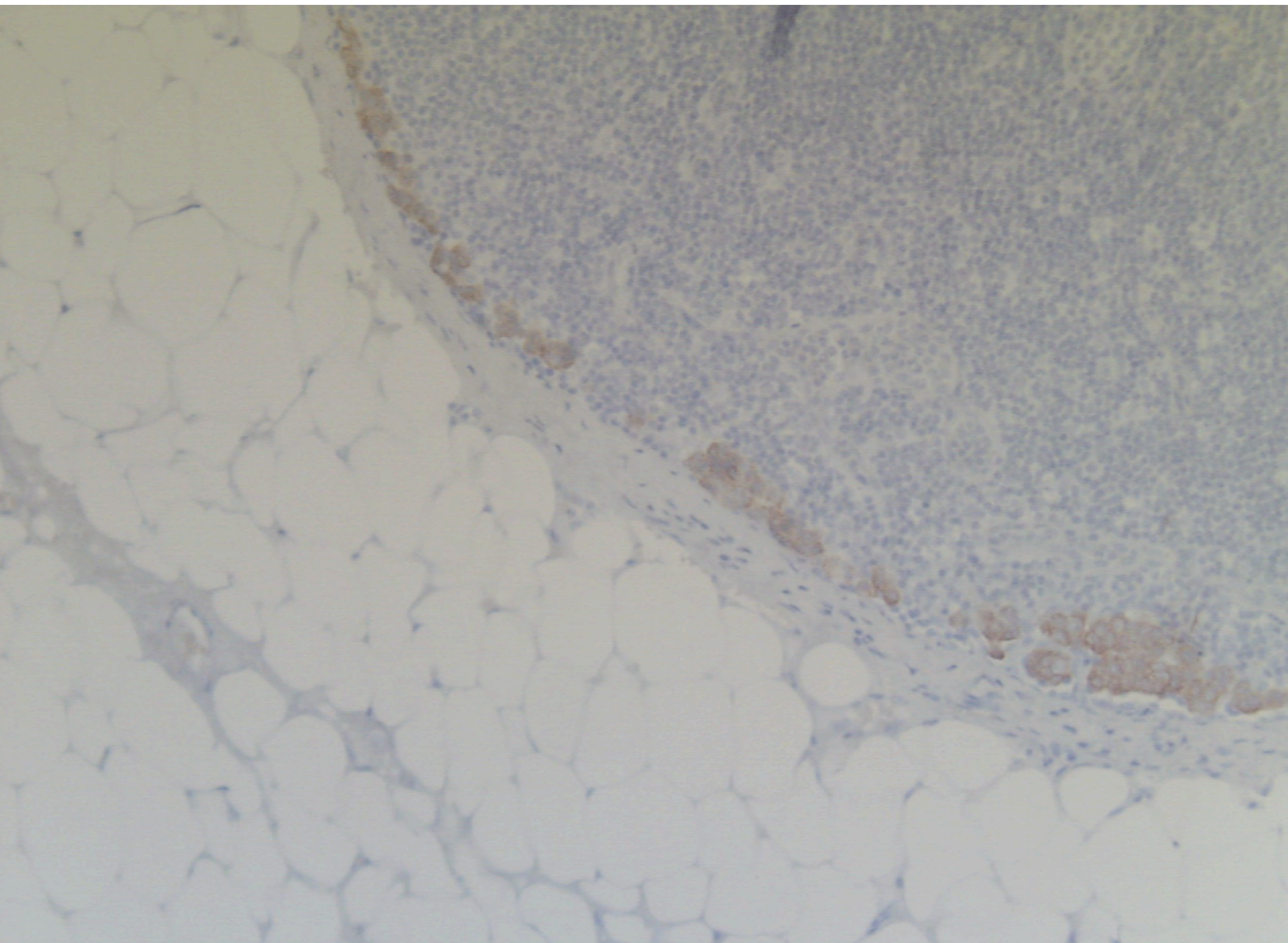


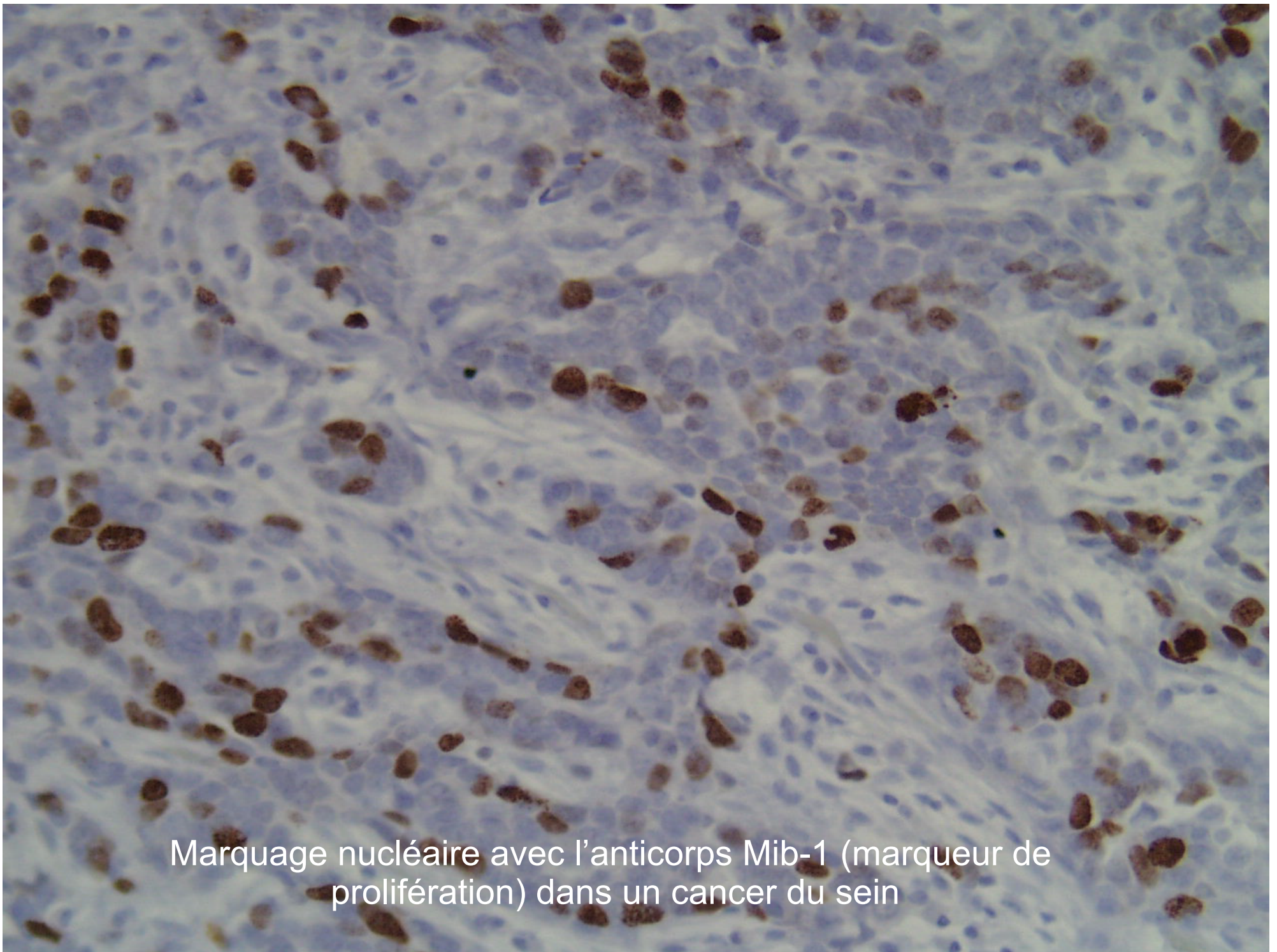
Métastase ganglionnaire d'un carcinome neuroendocrine (HE)



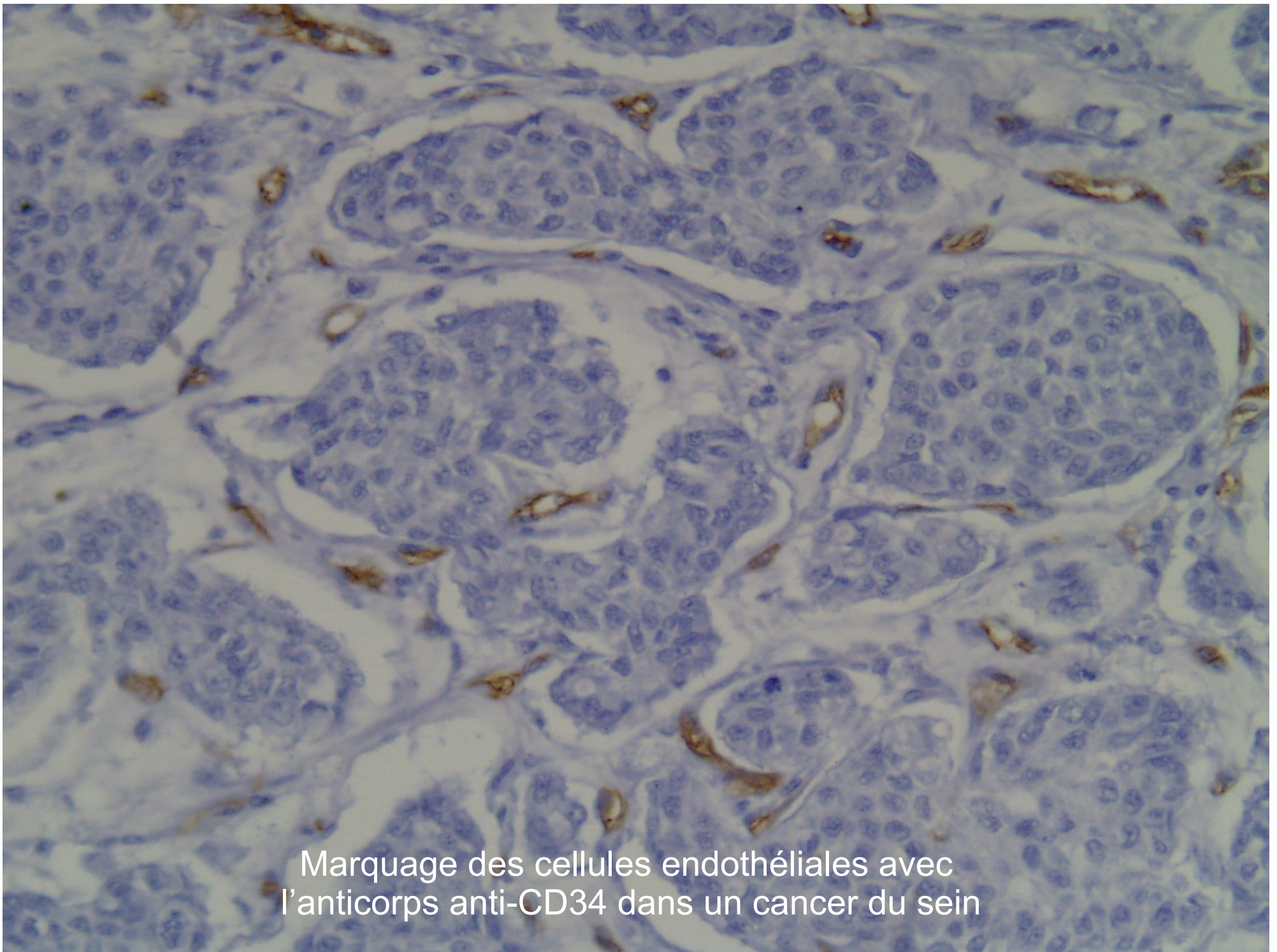
Immunomarquage avec l'anticorps anti-chromogranine





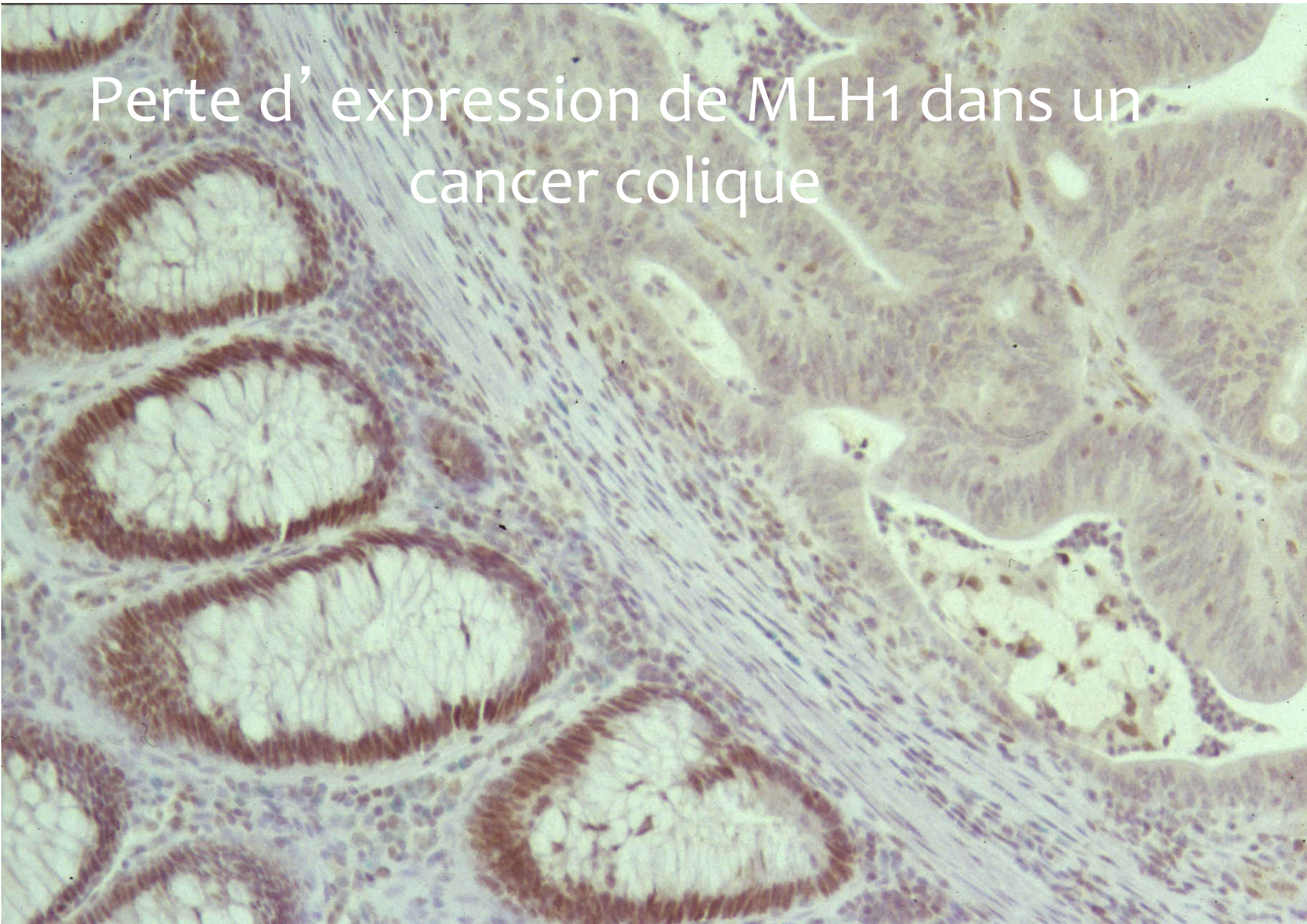


Marquage nucléaire avec l'anticorps Mib-1 (marqueur de prolifération) dans un cancer du sein



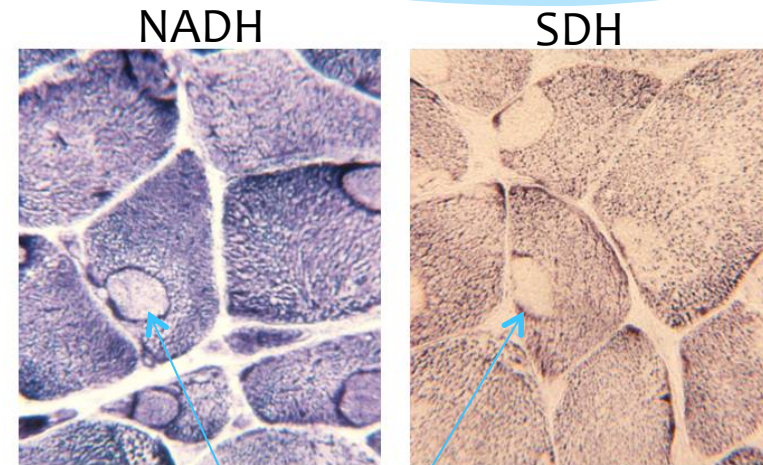
Marquage des cellules endothéliales avec l'anticorps anti-CD34 dans un cancer du sein

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
- \* amplification de gène par augmentation du nombre de copies : *Cerb2* dans le KC du sein

# Techniques spéciales liées au prélèvement

# Techniques spéciales liées au prélèvement

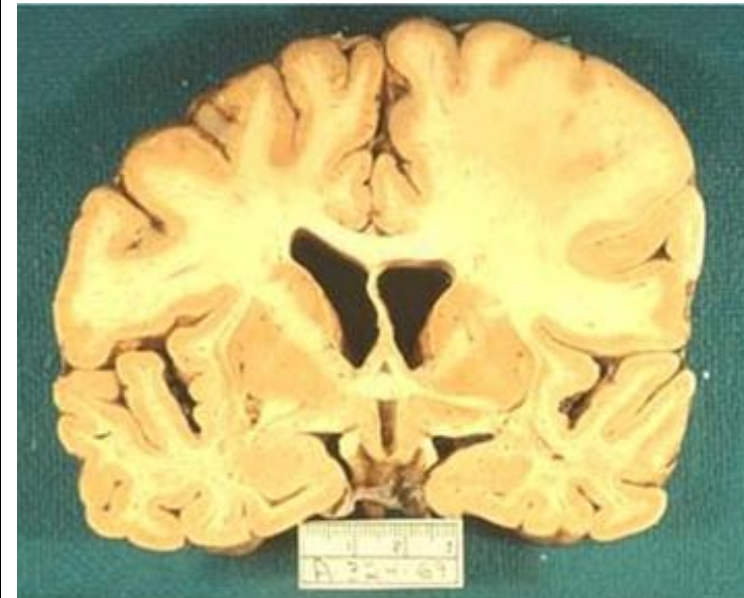
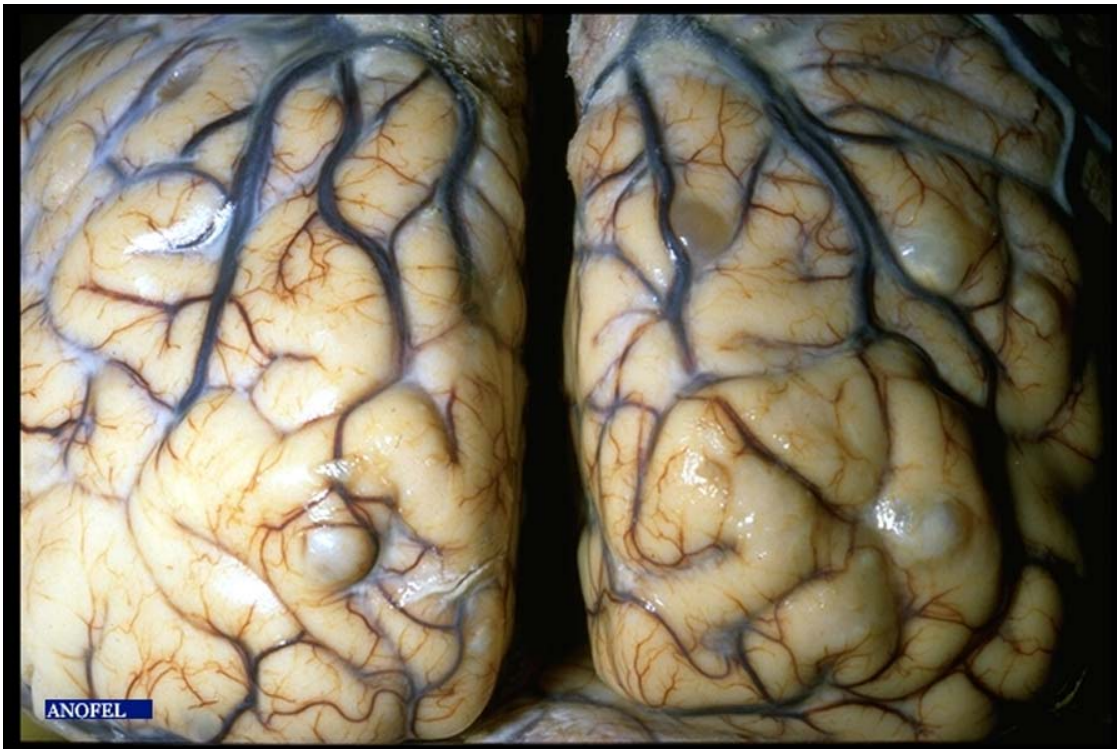
- \* **Prélèvement osseux** : consistance supérieure à la paraffine.
- \* **Deux techniques peuvent être utilisées:**
  - \* Technique de décalcification par bain dans une solution d'acide faible puis inclusion en paraffine +++
  - \* Inclusion en résine plastique permettant d'obtenir des coupes de 1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

# 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