

UE2 Biopathologie cellulaire et tissulaire

Pr Anne Lavergne-Slove

Le 7/11/2016 de 13h30 à 15h30

Ronéotypeur : Sylvain HOM

Ronéoficheur : Sixtine FABRE

# Cours n°1 : Anatomie et cytologie pathologiques

## Buts, techniques, résultats

*Informations sur l'UE2 anatomie-pathologie : 5 cours de 2 h (Dont deux cours interactifs [lésions élémentaires ; cicatrisation/inflammation chronique] à préparer et venir avec son smartphone sur <http://moodle.sorbonne-paris-cite.fr>) et 2 ED 2 heures*

*2 ED, mais les lames virtuelles étant non fonctionnelles cette année, ils sont remplacé par ED traditionnel pour le moment car le site Moodle de la fac ne fonctionne pas correctement.*

*Modalités examen L2, durée 1h30*

*2 questions rédactionnelles (Biophysique/ Histologie/ Ana Path), y compris sur l'ED avec images intégrées dans la question*

*Une partie des 30 QCM*

*Référence en anatomie pathologique :*

*Pathologie générale, Collège universitaire français des pathologistes, Coordination : JF Emile, Campus illustré : Elsevier 2012*

*Disponible en ligne sur : <http://umvf.univ-nantes.fr/anatomie-pathologique/>*

*Le cours peut paraître difficile car peu de personne a déjà vu un service d'anatomo-pathologie c'est pourquoi la professeure, qui était chef de service à Lariboisière, se propose de faire visiter son service. Pour ceux qui le souhaite, il faut soit la contacter par mail sur [anne.lavergne-slove@aphp.fr](mailto:anne.lavergne-slove@aphp.fr), soit par téléphone.*

*La professeure a refusé de relire la ronéo car elle considère que le livre de référence cité ci-dessus est suffisant dans le cas où des explications complémentaires sont nécessaires.*

Plan du cours :

### **I – Anatomie-Pathologie**

- 1) Définition et intérêt diagnostique
- 2) Étude des lésions
- 3) Conditions préliminaires à l'examen anatomo-pathologique

### **II – Cytologie**

- 1) Catégorie de prélèvements
- 2) Techniques
  - A) Cytologie en milieu liquide
  - B) Frottis traditionnel
  - C) Apposition ou empreinte
- 3) Indications et limites

### **III – Étude macroscopique**

- 1) Pièces opératoires
- 2) Exemples

### **IV – Histologie**

- 1) Biopsie
- 2) Techniques standard
  - A) Fixation
  - B) Inclusion
  - C) Coloration
- 3) Techniques particulières
  - A) Examen extemporané
  - B) Congélation
  - C) Immunohistochimie/immunocytochimie
  - D) Technique de biologie moléculaire in situ
  - E) Microscope électronique

### **V – Risques en anatomo-pathologie et autopsie**

- 1) Risques infectieux
- 2) Risques toxiques
- 3) Autopsie/nécropsie

### **Conclusion**

## **Introduction**

L'anatomie-pathologie générale, même si elle a lieu dans les laboratoires, correspond à un acte de diagnostic et non à de la biologie (pas de dosage ou de machine qui fait des calculs). En plus de cette démarche diagnostique, on observe aussi une activité de recherche comme dans tous les services de médecine. L'anatomie-pathologie a donc une importance dans tous les domaines de spécialités en médecine.

## **I – Anatomie-Pathologie**

### 1) Définition et intérêt diagnostique

L'anatomie pathologique générale est l'étude des grands processus pathologiques à l'échelon cellulaire et tissulaire, notamment :

- L'inflammation
- La pathologie vasculaire
- Les désordres nutritionnels et métaboliques
- Les processus tumoraux (que nous reverrons l'année prochaine)

L'anatomie pathologique spéciale est l'étude des lésions dans un tissu ou viscère particulier, par exemple : la pathologie pulmonaire, digestive, dermatopathologie, néphropathologie, neuropathologie, etc.

L'anatomo-pathologie est une discipline médicale : le diagnostic est fait par interprétation du médecin anatomo-pathologiste de ce qu'il voit dans les différentes coupes qu'il réalise. En effet, le clinicien qui observe son patient se demande ce qu'« Il » a, si son trouble est grave, quel serait le traitement le plus efficace, etc.

Le clinicien fait alors des prélèvements de tissus ou de cellules (l'anatomo-pathologiste ne travaille par sur le sang) et les envoie à l'anatomo-pathologiste qui regarde à l'œil nu (étude macroscopique) ou au microscope (étude histologique ou cytologique).

L'anatomo-pathologiste donne une réponse de diagnostic, de pronostic et de traitement face à un patient donné. L'interprétation des prélèvements se fait à partir des renseignements cliniques (demande d'examen) et de l'histoire du patient, qui constituent le seul contact du médecin anatomo-pathologiste avec le patient, car sans ces informations, il n'y aurait qu'une description du prélèvement.

### 2) Étude des lésions

L'anatomie-pathologie constitue l'étude des lésions, survenant au cours d'une maladie (cause ou conséquence de la maladie), prélevées et examinées soit l'œil nu (macroscopie) soit avec un microscope.

Le microscope peut être photonique ou « optique » : il grossit jusqu'à 1000 fois mais souvent le grossissement de 400 est suffisant. L'étude microscopique des cellules isolées est la cytologie ou cytopathologie alors que l'étude microscopique d'un tissu en globalité constitue l'histologie, se faisant sur biopsie, pièce opératoire complète (estomac, mandibule, rein, prostate, vessie) ou en autopsie

Le microscope peut aussi être électronique : l'étude est dite ultra-structurale avec un grossissement de 40000 mais elle est maintenant réservée à la recherche et beaucoup moins utilisée dans la démarche diagnostique. La microscopie électronique est supplantée par d'autres techniques comme l'immunohistochimie.

Rappels de quelques notions :

Un tissu est l'ensemble des cellules et des substances intercellulaires. En histologie, on étudie aussi bien les cellules, les substances intercellulaires mais aussi leurs relations, qui peuvent avoir un intérêt diagnostique. Les seules anomalies cytologiques (c'est-à-dire des cellules isolées) ne suffisent parfois pas à élaborer un diagnostic précis notamment en pathologie tumorale.

Une lésion est une altération morphologique d'un élément vivant qui peut toucher n'importe quel élément du tissu : du plus petit constituant jusqu'à la totalité d'un viscère. La lésion est décelable par un moyen quelconque d'observation au cours d'un état pathologique et est la cause ou la conséquence d'un processus morbide.

Par exemple, l'infarctus du myocarde est une nécrose du tissu myocardique, généralement due à une lésion des artères coronaires qui se bouchent à cause de l'athérosclérose et d'une thrombose. Ici, l'athérosclérose et la thrombose font partie des lésions mais la nécrose du myocarde fait aussi partie des lésions. La cause de l'infarctus du myocarde est la thrombose et sa conséquence est la nécrose du myocarde.

En fonction de ce qu'on étudie, on aura une échelle différente. Ainsi l'étude des lésions d'organites se fera en microscopie électronique, celles des cellules en microscopie optique ou électronique, enfin l'observation des lésions des tissus et des viscères se fera soit en microscopie électronique ou optique, soit à l'œil nu. Pour que la lésion soit observable à l'œil nu, il faut qu'un large territoire du tissu (autrement dit de nombreuses cellules) ait été touché : on parle alors de lésion macroscopique.

### 3) Conditions préliminaires à l'examen anatomo-pathologique

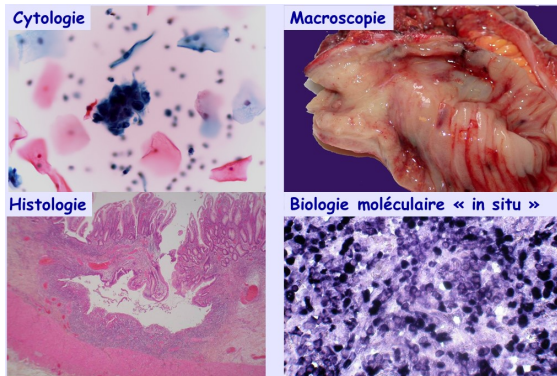
L'examen anatomo-pathologique est un diagnostic qui repose sur une interprétation et non une mesure exacte : c'est un acte de diagnostic anatomo-clinique. Il est nécessaire d'avoir des renseignements sur le patient, donnés par le clinicien qui a prescrit ou réalisé le prélèvement.

Ces renseignements sont l'état civil, les antécédents, la symptomatologie actuelle, les traitements en cours ou passés, les données cliniques, biologiques, d'imagerie (radiologique), d'exploration endoscopique (on voit l'intérieur d'un canal : bronche, vessie, tube digestif ; on observe et on prélève), etc.

Par exemple : pathologie d'apparition brutale, pathologie chronique, le patient prend-il déjà des médicaments, antécédents médicaux ou chirurgicaux connus, CRP augmentée ou non, numération normale ou non, enzyme fonctionnelles ou non, etc. En pathologie osseuse, on ne fait pas de diagnostic anatomo-pathologique sans connaître l'exakte localisation, l'évolution, l'aspect radiologique, etc.

Ici, on observe en cytologie des cellules isolées, leur morphologie cellule par cellule pour savoir si elles sont normales ou non.

L'examen macroscopique de la pièce opératoire montre un segment d'intestin grêle avec la maladie de Crohn (maladie inflammatoire du tube digestif) qui nécessite parfois de retirer des segments d'intestin grêle. Sur l'image, on voit l'intestin grêle ouvert : la lumière avec une sténose et les parois sont épaissies.



L'examen histologique après avoir techniqué le prélèvement permet au médecin anatomo-pathologiste de connaître l'histoire clinique du patient en interprétant les données macroscopiques et microscopiques.

Enfin, on peut compléter l'étude avec de la biologie moléculaire in situ ou une étude immuno-histochimique qui sont plus spécifiques.

## II – Cytologie

### 1) Catégorie de prélèvements

L'analyse cytologique, c'est l'étude des cellules isolées dans un contexte tissulaire, déposées sur une lame de verre. On peut prélever :

- Des liquides :
  - Physiologiques
    - LCR : normalement, il ne contient pas de cellule
  - Qui ne devraient pas être présents ou pathologiques
    - Épanchement des séreuses : ce phénomène est pathologique car en temps normal, il n'y a pas de liquide entre deux feuillets de plèvre, deux feuillets péricardiques ou dans la cavité péritonéale ; on espère, par une ponction, trouver des cellules expliquant la présence de liquide
- Ex : Ascite : épanchement péritonéal, Pleurésie : épanchement pleural
  - On recherche la présence de cellules tumorales ou inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes) ou de cellules suspectes d'être tumorales.
- Lavage : broncho-alvéolaire consistant en une injection de liquide sous pression qui ramasse des cellules au passage puis on ré-aspire le liquide pour l'analyser
- Autres liquides : épanchement articulaire comme celui du genou. On étudie la présence ou non de corps étrangers dans le liquide. Dans le cas de la goutte, on peut se demander s'il s'agit d'une poussée d'acide urique ou d'une chondrocalcinose. Le diagnostic se fait à partir de la ponction.
- Grattage ou brossage
  - Frottis cervical (col utérin) permettant de faire des dépistages. Intuitivement, on comprend cette technique : en gratouillant une muqueuse, on recueille des cellules et on les étudie. Cette technique est non douloureuse, rapide et fiable.
  - Frottis d'une lésion buccale atypique ou d'une lésion génitale autre.
  - Brossage bronchique ou œsophagien : si on observe un dépôt bizarre dans la muqueuse œsophagienne lors d'une endoscopie, on récupère avec une brosse des cellules.

- Apposition de pièces opératoires
  - o Exemple : un ganglion lymphatique découpé et posé sur une lame. Par adhérence, les cellules restent collées à la lame. Ensuite, on peut analyser le ganglion par des méthodes histologiques, notamment pour l'hématologie et la neurologie.
- Cytoponction à l'aiguille fine +/- sous contrôle écho ou scanner, d'une masse, d'un organe plein ou d'un kyste
  - o Cette technique permet d'effectuer de petites aspirations de nodules en profondeur sans que le patient soit au bloc opératoire : il s'agit d'une aspiration sans biopsie qui ne nécessite qu'une anesthésie locale. Ex : nodule du sein, thyroïde, lésion pancréatique, lésion hépatique.

## 2) Techniques

### A) Cytologie en milieu liquide

La technique de référence en cytologie est la cytologie en milieu liquide. Le principe est d'immerger dans un liquide de conservation les cellules récupérées, quelle que soit la méthode utilisée (ponction, frottis), les cellules sont en suspension : on obtient une dispersion. Ces cellules peuvent être concentrées par centrifugation et filtration et on dépose ces cellules en couche très mince sur une lame.

L'intérêt de cette technique en milieu liquide par rapport au frottis traditionnel est qu'on a un stock de cellules pour un prélèvement donné : c'est une « réserve » de matériel en cas de besoin. Autrefois, lors d'un frottis du col utérin, on récupérait les cellules sur une lame, on faisait un deuxième prélèvement et c'étaient les seuls supports que l'on avait pour une patiente donnée.

Comme nous possédons désormais des techniques complémentaires d'étude (immunocytochimie, biologie moléculaire, hybridation in situ), il est préférable d'avoir une réserve de cellules sur lesquelles on pourra, s'il y a une indication, faire ces autres tests. Avec cette technique, on peut faire un typage HPV pour une cytologie cervicale.

### B) Frottis traditionnel

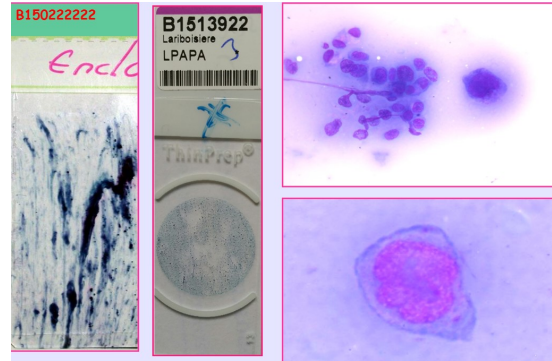
Le frottis traditionnel (ancien) est l'étalement d'emblée ou à partir d'un culot de centrifugation d'un liquide ou de la brosse sur une lame. Le culot de centrifugation constitue déjà une réserve cellulaire, que l'on peut mettre en milieu liquide si nécessaire. Il faut ensuite fixer les cellules de la lame par dessiccation ou séchage à l'air ou par une laque (souvent, on secoue la lame). Enfin, on colore les cellules par des techniques de cytologie.

2 noms à connaître : le Papanicolaou (très utilisé en pathologie tumorale) et le May Grünwald Giemsa (MGG en hématologie).

### C) Apposition ou empreinte

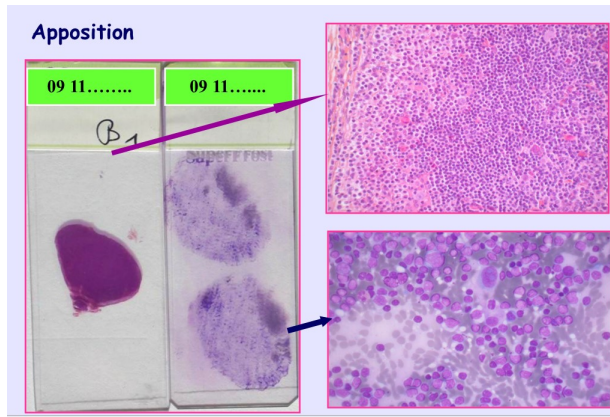
L'apposition ou empreinte ne permet de pas disposer de réserve de matériel.

En phase finale on obtient ces données (cf. en bas à droite). Rien que par l'analyse de la cellule, on a des idées de la pathologie du patient : la cellule a un très fort rapport nucléo-cytoplasmique, le noyau a une chromatine de répartition irrégulière, un très gros nucléole, la forme du noyau est irrégulière, convolutive, bosselée. Ce sont des caractères cytologiques de malignité tumorale. Mais attention, ce n'est pas spécifique : si le patient a reçu une radiothérapie, celle-ci a peut-être induit ces modifications cellulaires. D'où l'importance des renseignements cliniques.



Lame de frottis traditionnel (cf. gauche)

Cytologie en milieu liquide (cf. milieu : le filtre est circulaire → l'échantillon a cette forme sur la lame)

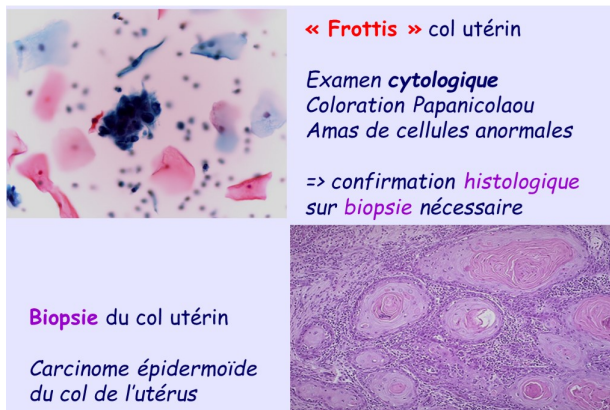


Apposition d'un ganglion lymphatique coupé en deux et déposé sur la lame.

On l'a techniqué pour l'examen histologique (en haut de l'image) et cytologique (en bas : cellules isolées), qui ont différents intérêts diagnostiques : on visualise très bien les caractéristiques précises des cellules en cytologie et en plus, en histologie, on peut étudier leurs relations par rapport aux autres et l'architecture.

Histo : tissu conjonctif, organisation tissulaire.

Cyto : cellules hémorragiques (car quand on coupe le ganglion, ça a un peu saigné)



Frottis du col utérin avec cellules anormales : l'examen cytologique montre une cellule toute rose avec gros noyau = critères cytologiques qui font suspecter un carcinome épidermoïde (tumeur maligne) du col de l'utérus.

Cet examen est complété par un examen histologique fait sur une biopsie, c'est-à-dire un prélèvement de tissu : on observe une organisation en massifs tumoraux avec autour un tissu infiltré et détruit par la prolifération tumorale.

### 3) Indications et limites

La cytologie permet :

- Des dépistages comme le frottis du col de l'utérus : non douloureux, non traumatisant et rapide.
- D'établir des diagnostics avec des aiguilles très fines dans des lésions profondes (bulbe de la thyroïde, ganglion médiastinal, lésion hépatique) : il s'agit d'un accès non chirurgical à une lésion

profonde pour comprendre sa nature. Cet acte est moins risqué qu'une ouverture chirurgicale de l'abdomen ou laparotomie.

- De compléter l'examen histologique notamment en hématologie où la morphologie cellulaire est de bien meilleure qualité en cytologie.

Les limites :

- Il faut que la technique soit bonne, que le frottis ne soit pas trop épais, que les prélèvements soient directement envoyés en laboratoire pour que ce soit bien préservé, que la fixation soit faite immédiatement.
- Il ne faut pas sur-interpréter les prélèvements de cytologie. Souvent, on peut porter un diagnostic définitif, mais parfois, il ne s'agit que de diagnostic d'orientation. Par exemple, une morphologie de cellules tumorales peut correspondre à des cellules normales par rapport aux renseignements cliniques du patient, mais aussi à des modifications cellulaires liées aux traitements, aux radiations.
- Ce diagnostic d'orientation sera complété par l'étude histologique (notamment l'examen extemporané lors d'un examen médical). C'est une histologie de « contrôle » si suspicion de malignité.

### III – Étude macroscopique

C'est l'examen à l'œil nu, à l'échelle tissulaire. Il est peu utile pour l'étude de petites biopsies mais l'examen macroscopique est fondamental lorsque l'on reçoit un estomac, une vessie, un larynx, un colon, une parotide, une prostate, une thyroïde. Il permet l'orientation anatomique et lésionnelle, de faire des mesures, des prélèvements usuels.

#### 1) Pièces opératoires

La pièce opératoire doit arriver fraîche au laboratoire, c'est-à-dire qu'elle sort du malade : elle n'est pas fixée et est envoyée directement et immédiatement au laboratoire. Sinon, le prélèvement pourrit : c'est l'autolyse. D'abord, on peut regarder s'il y a des lésions, leur localisation, leur taille, on peut les photographier, peser la pièce opératoire, etc. Toutes ces données pourront faire partie du dossier patient. Ensuite, on peut faire des fixations diverses comme avec de la glutaraldéhyde.

Sur cette pièce opératoire fraîche on pourra faire des techniques particulières : apposition pour la cytologie, congélation et conservation dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  qui constitue la tissuthèque ou tumorothèque, pour pouvoir faire des études moléculaires ultérieures sur ces prélèvements congelés (ils ne seront pas altérés par les fixateurs). Ces prélèvements congelés sur pièces fraîches sont la justification à leur arrivée en laboratoire.

Des fixations particulières sont parfois nécessaires si on veut étudier les prélèvements en microscopie électronique, mais c'est rare.

#### 2) Exemples

Gauche : Segment de colon fermé avec le gras du péritoine autour.

Droite : on ouvre et on voit à l'intérieur la lésion. On fait un petit prélèvement que l'on met dans le congélateur et pour la conserver et faire les techniques ultérieures

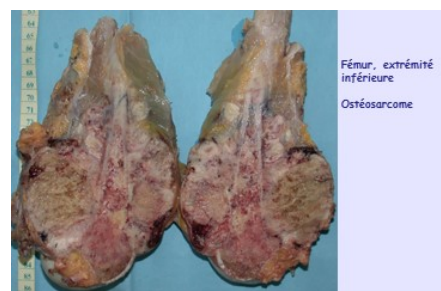




On doit fixer pendant 24h ou 48h la pièce opératoire avec du formol, qui est le fixateur de référence (formol neutre, tamponné, à 10%). Après cette fixation au formol, on peut encore faire de nombreuses études moléculaires. Enfin, on fait des prélèvements : la lésion, les limites d'exérèse (cf. dans la suite du cours) pour savoir si le chirurgien a bien tout retiré, comment est la paroi digestive à côté de cette lésion évidente : il est possible qu'il y ait des lésions moins évidentes à côté. Le prélèvement permet aussi de savoir s'il y a une pathologie sous-jacente ne se traduisant pas par des lésions macroscopiques mais seulement histologiques. Même sur une zone normale, on peut et parfois doit faire des prélèvements.



Tumeur de fémur : on a coupé la tumeur, on voit un peu d'os persistant, correspondant à la prolifération tumorale qui a détruit et envahit l'os. On fait des prélèvements, on étudie les limites, les extensions dans le tissu environnant, puis on classe la tumeur en cherchant des éléments de pronostic par différents marqueurs et on essaye de voir quel traitement peut fonctionner pour la pathologie étudiée.



#### **IV – Histologie**

##### 1) Biopsie

La biopsie est un prélèvement d'un fragment de tissu sur un être vivant par différentes techniques. On peut faire :

- Biopsie « simple » avec une partie de la lésion. Par exemple, lors d'une endoscopie digestive (coloscopie), on voit une grosse tumeur colique, on en prélève un morceau pour voir de quel type de tumeur il s'agit.
- Ponction biopsie : un trocart (biopsie ostéo-médullaire/osseuse), une aiguille (organes pleins : foie, rein, prostate). Par exemple, lors d'une lésion hépatique : on pense soit à une maladie du foie qui implique un prélèvement à l'aveugle car on pense que la maladie est globale, soit à un nodule spécifique qu'on étudie avec une aiguille à travers une carotte biopsique.
- Biopsie exérèse consistant à retirer en totalité la lésion. On peut enlever la totalité de la lésion pour un petit nævus cutané.

On peut aussi utiliser :

- Un scalpel
- Une pince lors d'une endoscopie haute ou basse (pour l'oesopharynx, l'estomac, le duodénum, le grêle, l'iléon, le colon, le rectum, etc.), d'une bronchoscopie ou d'une cystoscopie (vessie)
- Un bistouri pour la peau et les muqueuses
- Un acte chirurgical
- La stéréotaxie qui est une technique neurochirurgicale permettant d'atteindre des zones du cerveau de façon précise.

Les biopsies doivent être d'une taille suffisamment grande. Par exemple, lors d'une biopsie d'un petit segment d'artère temporale dans le cadre d'une artérite de Horton (céphalées violentes chez les gens âgés) dont le diagnostic est urgent (avec corticothérapie sinon risque de cécité). Pour cette maladie, il

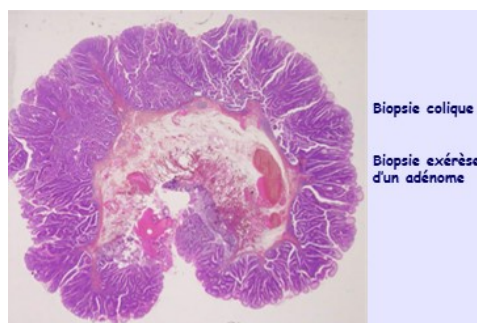
s'agit de lésions segmentaires : il faut prendre un segment suffisamment long et la norme est de 15mm. On adapte les biopsies à ce qu'on voit et ce qu'on recherche. Si on a un polype de colon de 5mm, on prélève l'ensemble de ce polype, même s'il mesure 2cm, on essaye de prélever la totalité.

Elles nécessitent que leur nombre soit suffisant car hétérogénéité des tumeurs, les lésions peuvent être focales. On doit bien choisir la zone biopsiée : d'abord, ne pas biopsier que la nécrose car on n'en fera pas de diagnostic. Il faut biopsier aussi à proximité, là où c'est un peu moins pathologique tout en n'oubliant pas de biopsier la nécrose.

Lors d'une amibiase (qui s'attrape avec les eaux contaminées), si on la recherche sur une ulcération colique et qu'on fait une biopsie à côté, on n'aura pas d'amibe... Par contre, si on biopsie la nécrose, on aura des amibes. En fonction de ce qu'on observe, il faudra ou non éviter une zone de nécrose et d'hémorragie ou encore éviter les prélèvements trop superficiels par exemple sous la muqueuse rectale lors d'une recherche d'amylose.

Il faut bien préserver les tissus c'est-à-dire ne pas étirer, écraser ou griller au bistouri électrique, mais aussi bien orienter et bien étiqueter les prélèvements (biopsies multiples). Dans le cas d'une lésion du colon droit ou gauche, il faut bien numéroter les différents flacons pour bien les identifier. Si on fait une erreur, c'est une erreur de diagnostic pour le patient qui peut être alors embêtant...

Lésion colique de type polype (lésion qui fait saillie) du colon droit. Lors de l'exploration endoscopique, on a retiré ce polype, on l'a coupé, on en a fait des tranches pour l'étudier histologiquement. La lésion est un adénome que l'on peut classer. On a alors la limite de l'exérèse qui permet de répondre à la question : est-ce que la lésion a été retirée en totalité ? Ici, on peut dire qu'effectivement, le polype a été enlevé en totalité. En plus, la lésion est bénigne donc elle n'envahit pas. Le patient est guéri de cette lésion.



Biopsie hépatique avec une aiguille dont le prélèvement a la forme de l'aiguille. Le patient a une maladie générale du foie (peut-être une intoxication éthylique, fibrose, stéatose). En regardant la lésion globale du parenchyme hépatique, on peut faire un diagnostic d'étiologie et de gravité des lésions.

Reconstitution de l'histoire globale du patient : on voit lors de l'exploration endoscopique du colon (coloscopie) la lésion végétante, sténosante, ulcérée. On en fait des prélèvements pour savoir la nature de la lésion, le traitement à adopter : chimio d'emblée ou chirurgie. La biopsie nous informe que c'est une lésion tumorale maligne : un adénocarcinome qui nécessite une chirurgie. On obtient la pièce opératoire avec le segment colique comportant la tumeur et on analyse la tumeur (zone d'infiltration maximale), on prélève les limites pour savoir si on a tout retiré et on recherche d'éventuels ganglions envahis.



## 2) Techniques standard

### A) Fixation

Première étape, la fixation consiste à « immobiliser et conserver les cellules et l'architecture tissulaire, de façon aussi proche que possible de leur aspect à l'état vivant ». Cette définition est à connaître par cœur !

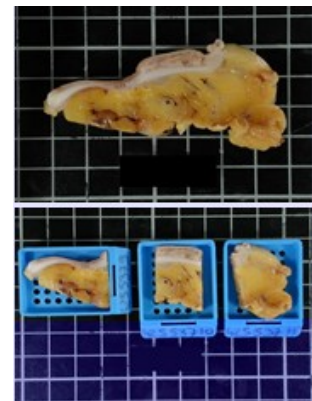
Il faut que ce soit mis en œuvre très rapidement sinon, on a autolyse du tissu. Si le tissu est altéré, il est alors difficile de savoir si ces altérations sont dues à l'autolyse ou à une véritable lésion du tissu. Il faut aussi le faire suffisamment longtemps : pour fixer une biopsie cutanée ou digestive, 4h peuvent suffire car c'est assez petit (2-3mm). Par contre, si on fixe un estomac, un colon, un fémur, il faudra 24h-48h voire plus pour que le fixateur pénètre le prélèvement. On a besoin d'un volume de fixateur adéquat : si on met un estomac avec 5cc de formol, on ne l'a pas fixé mais on l'a laissé pourrir... Le choix du fixateur se fait en fonction des techniques complémentaires éventuelles ou de la taille du prélèvement. En pratique, pour simplifier les choses, on considère qu'il n'y en a qu'un : le formol neutre, tamponné, 10%, transparent. On peut aussi utiliser l'AFA (alcool, formol, acide acétique) transparent ou le liquide de Bouin (acide picrique et formol) qui est jaune mais ils sont moins bien pour la biologie moléculaire.

Le formol a comme intérêt de ne pas trop modifier les couleurs. Certes, il y a une petite modification des couleurs entre le prélèvement frais et celui fixé car il y a autolyse mais cette modification n'est pas majeure. Le formol est très toxique : il ne faut pas le sentir. On a longtemps essayé de remplacer le formol par un fixateur moins toxique mais le formol est le moins toxique qu'on ait trouvé.

### B) Inclusion

Prélèvement sur une grosse pièce opératoire : on obtient un segment. On fait une fixation et on dépose le prélèvement dans une cassette = petite boîte avec des trous au fond. Si on a une grosse tumeur du colon à étudier, il faut la fractionner, la mettre dans ces cassettes et veiller à étiqueter correctement (numéro du patient et sous-numéro) les échantillons pour par exemple pouvoir reconstituer les limites ou savoir si l'exérèse est complète ou non.

Après la fixation, la cassette est placée dans un automate à inclusion qui déshydrate le prélèvement (bains d'alcool successifs). Il plonge le prélèvement dans des bains de toluène qui enlève les graisses. Ensuite, la cassette est imbibée dans de la paraffine liquide chaude (lorsqu'elle est froide, elle devient solide) qui prend alors la place de l'eau et des graisses qui ont été retirées.



On met ce bloc de paraffine sur une plaque froide pour qu'il se solidifie et on en fait des coupes avec un microtome (coupe de 4µm) : on obtient un ruban de paraffine. On étale ces coupes sur une lame de verre, on les colore et on les examine.

### C) Coloration

Souvent pour la coloration, on utilise des automates à colorations à travers des bains : il faut d'abord éliminer la paraffine, on réhydrate ensuite par des bains décroissants d'alcool et on colore. Par contre, on ne peut pas remettre les graisses donc on ne peut pas colorer les graisses sur une lame après inclusion en paraffine

La coloration standard de base est appelée HES. Elle est tri-chromique :

- H pour hématoxyline qui colore les noyaux en bleu
- E pour éosine qui colore le cytoplasme en rose
- S pour safran qui colore les substances conjonctives en jaune

On peut faire aussi des colorations dites spéciales ou complémentaires : elles permettent d'identifier des substances vues sur la lame HES ou de rechercher un élément que l'on ne voit pas en technique standard. Avec ces colorations histochimiques « spéciales » on met en évidence des constituants particuliers tels que :

- Des cellules produisant du mucus, du glycogène, des pigments
- De la matrice extracellulaire contenant des fibres élastiques et de l'amylose
- Des agents infectieux comme des bactéries, parasites, champignons, etc.

Par exemple :

- PAS (Periodic Acid Schiff) colore les mucopolysaccharides neutres et le glycogène en rouge
- Perls colore le fer en bleu (important pour les pathologies hépatiques)
- Fontana colore la mélanine en noir (pour retrouver une tumeur indifférenciée que l'on ne voit pas)
- Bleu alcian colore les mucopolysaccharides acides en bleu
- Orcéine permet de voir les fibres élastiques par argentation
- Dans le cas de l'amylose, on a un dépôt vasculaire et interstitiel de substance pathologique colorée au rouge Congo et présentant un dichroïsme en lumière polarisée
- Warthin Starry permet de voir la spirochétose colique : bactéries accrochées au pôle apical du colon
- Grocott (argentation) et PAS permettent de voir la candidose
- Ziehl permet d'observer des mycobactéries comme le bacille de Koch pour la tuberculose (bâtonnets roses)

### 3) Techniques particulières

#### A) Examen extemporané

L'examen extemporané est une technique d'analyse histologique rapide réalisée en cours d'intervention chirurgicale. Les résultats sont obtenus après 20 minutes, de façon immédiate, au téléphone et orientent les suites de l'intervention : **de la réponse de l'examen anatomo-pathologique découle le geste chirurgical**. Le geste chirurgical dépend du résultat de l'examen anatomo-pathologique.

Cette technique est différente des techniques standards qui demandent environ 24h. On veut une coupe histologique du prélèvement frais que l'on puisse colorer et analyser. Pour cela, on congèle avec un cryostat (chambre froide) à -30°C pendant quelques minutes. Il faut que le prélèvement ne soit pas trop gros : 1 à 2 cm max de côté et quelques mm d'épaisseur. Une fois durci, on coupe le prélèvement avec un microtome (4µm) spéciale car il coupe la congélation. Puis on colore avec un peu d'hématoxyline, d'éosine voire un peu de safran.

L'indication de cet examen est d'orienter et de modifier le geste chirurgical :

- de déterminer la nature de la lésion : tumorale (bénin, malin), non tumorale (inflammatoire)
- de savoir si la lésion est liée à une pathologie antérieure ou si c'est nouveau par rapport à ce qu'on attendait
- d'identifier un prélèvement : ganglion, parathyroïde, zone lésionnelle représentative permettant de faire un diagnostic
- d'étudier les limites d'exérèse d'une tumeur (ex : mélanome cutané où on veut être au plus proche de ce mélanome et dans une zone obligatoirement saine. Si ce n'est pas le cas, le chirurgien retourne

vers le patient pour élargir la zone d'exérèse. Par contre, pas pour une gastrectomie où les limites d'exérèse font 20cm de diamètre)

La première limite est le temps car pour un prélèvement mobilisant un technicien et un médecin, on attend 20 minutes et la qualité de l'examen n'est pas aussi bonne qu'en technique standard. De plus, après la congélation, si on retire le prélèvement du congélateur, il décongèle, se dégrade et la morphologie est altérée. S'il s'agit d'une lésion volumineuse, elle ne peut pas être examinée en totalité... Mais dans tous les cas, on fait un contrôle histologique avec fixation au formol, inclusion en paraffine pour s'assurer que le diagnostic est bon.

Exemple : une parotide fraîche est ouverte et on voit une tumeur. On fait un prélèvement sur la tumeur pour savoir si la lésion est bénigne ou maligne, s'il faut faire un curage ganglionnaire : on précise la nature de la prolifération tumorale. On congèle le prélèvement, on coupe au cryostat, on colore ensuite les lames et on donne une réponse au chirurgien sur le diagnostic de la tumeur.



## B) Congélation

La congélation peut être exécutée pour l'examen extemporané avec le cryostat à  $-30^{\circ}\text{C}$ . On peut aussi utiliser de l'azote liquide pour la conservation au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  de morceaux d'une pièce opératoire fraîche dans le cas où des examens complémentaires sont nécessaires. Il s'agit de tissuthèque ou tumorothèque dont la législation est lourde d'autorisations de prélèvement à but scientifique en plus des contraintes de l'utilisation à but diagnostic.

La congélation est utile pour la biologie moléculaire, c'est-à-dire l'étude d'ADN et d'ARN par PCR. Éventuellement, l'immunohistochimie est réalisable sur coupes congelées pour les antigènes dénaturés par la fixation.

La congélation doit se faire de façon très rapide et dans de bonnes conditions car sinon, les acides nucléiques sont dégradés par des enzymes : les ARNase et ADNase. Il existe des systèmes d'alarme de surveillance des températures sur les congélateurs : ce sont des infrastructures lourdes avec des gens de garde. La gestion de ces collections se fait en conformité avec la loi : information du patient, consentement éclairé pour l'utilisation à visée scientifique, etc.

## C) Immunohistochimie/immunocytochimie

L'immunohistochimie et l'immunocytochimie complètent les colorations standards et spéciales. On met en évidence spécifiquement des structures antigéniques dans les tissus, sur une coupe histologique ou sur une lame de cytologie, pour préciser un diagnostic, un pronostic et une indication thérapeutique.

Les antigènes sont de localisation variée : membranaire, cytoplasmique, nucléaire, protéine de la matrice extracellulaire. Les antigènes sont mis en évidence par l'application d'un anticorps spécifique sur une coupe. À travers une méthode de révélation, on voit si l'anticorps s'est fixé sur un antigène. Si c'est le cas, on a la nature d'un antigène présent dans la coupe.

Cette technique permet de :

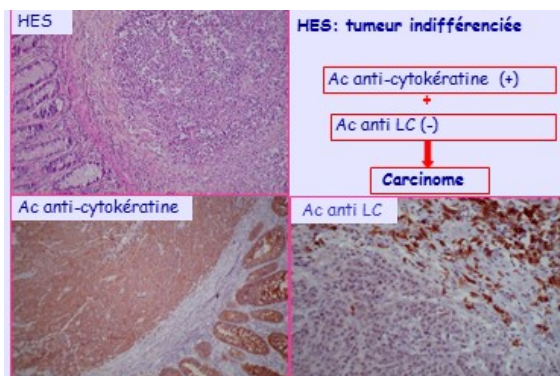
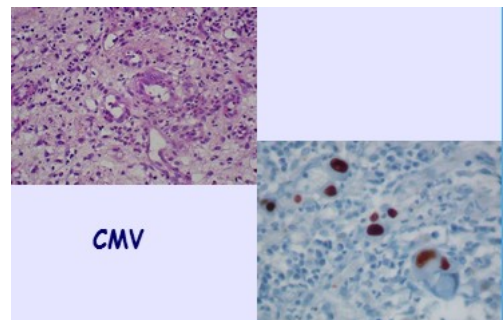
- Diagnostiquer, classifier une tumeur : épithéliale (Ac-anti-EMA : epithelial membran antigen) conjonctive, lymphoïde (Ac-anti-LC : lymphocyte commun, -CD3 : LT, -CD20 : LB)
- Mettre en évidence un agent infectieux : CMV (cytomégalovirus), virus de l'herpès, ou une sécrétion : sérotonine.



- Établir un pronostique : mise en évidence de protéines oncogènes, de récepteurs aux œstrogènes, récepteurs protéine HER-2 (cancer du sein, de l'estomac), récepteurs à la progestérone, etc.
- Savoir quel est le traitement à utiliser dans le cas de la tumeur du patient : adapter le mieux possible la thérapeutique à l'identité tumorale d'un patient donné.

La méthode immunoenzymatique indirecte se fait sur une coupe avec inclusion en paraffine ou sur une coupe congelée ou encore sur des cellules isolées en cytologie. On applique un anticorps primaire spécifique puis un anticorps secondaire (anti-lapin, souris) couplé à une enzyme, à laquelle on fournit un substrat. Le produit coloré issu de la réaction enzymatique apparaît au niveau des complexes Ag-Ac si la liaison a eu lieu.

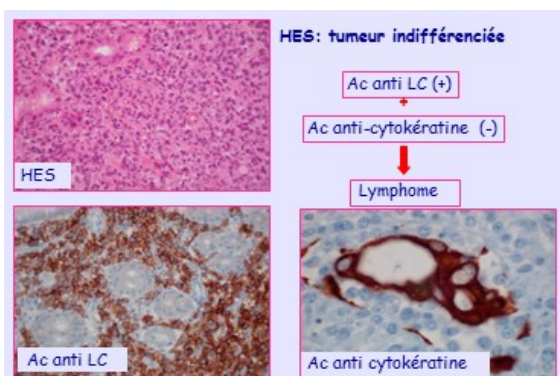
Ex : Sur coupe histologique, on recherche de CMV (cytomégalovirus). On voit des vaisseaux capillaires car le CMV a une forte affinité pour les cellules endothéliales et péricytaires, c'est pourquoi lors d'une infection à CMV, les manifestations cliniques sont différentes : manifestation oculaire, cardiaque, digestive, etc. À proximité des vaisseaux, on voit une énorme cellule avec un gros cytoplasme et un gros noyau, suspecte de correspondre à un CMV. On confirme cette hypothèse par une étude immunohistochimique avec Ac anti-CMV : la cellule est marquée mais autour, on en voit d'autres qui n'étaient pas détectées par des techniques standards. Le patient a une infection à CMV



Par technique standard, on observe la paroi colique avec des glandes du colon, la musculaire muqueuse et une tumeur (grosse cellule tumorale) → est-ce une tumeur épithéliale ou une tumeur lymphoïde ou autre chose ?

Pour préciser la nature d'une tumeur, on utilise des Ac anti-cytokératine marquant des filaments des cellules épithéliales : ils marquent toutes les glandes normales du colon (ce qui est normal car les glandes font parties du tissu épithélial) et la tumeur. Cette tumeur est donc épithéliale. Ceci est confirmé par le marquage avec des Ac anti-LC : la tumeur n'est pas

marquée par ce second anticorps. Les lymphocytes physiologiques circulant dans le tissu sont marqués : ils nous permettent de faire un contrôle interne. L'intérêt de travailler sur une coupe histologique permet d'étudier le tissu dans sa globalité. On en conclut qu'il s'agit d'un carcinome.



Même situation que précédemment, cette fois-ci dans l'estomac : pour l'Ac anti-LC, les cellules tumorales sont marquées et les glandes gastriques qui persistent ne le sont pas, ce qui est normal. L'Ac anti-cytokératine semble marquer les cellules tumorales mais ce n'est pas le cas ! Il marque seulement les restes de glandes grignotées par les cellules tumorales.

Il faut interpréter en fonction de la localisation du signal par l'analyse morphologique : ce n'est pas parce qu'une zone est marquée, qu'elle est pathologique.

#### D) Techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire in situ mettent en évidence sur des coupes tissulaires (après congélation ou inclusion en paraffine ou en cytologie sur cellule isolée), ou sur des étalements cellulaires, des séquences d'ARN ou d'ADN, par des sondes d'acides nucléiques complémentaires révélées par une enzyme, un fluorochrome (FISH) ou un traceur radioactif (mais pas en anatomo-pathologie pour ce dernier). L'étude in situ se fait au sein du chromosome en configuration native.

On peut faire une hybridation in situ classique (ISH) pour détecter les acides nucléiques de virus (HPV : human papillomavirus, EBV : Epstein-Barr virus, herpès) ou l'ARN immunoglobulinique. Il est possible de faire des hybridations plus sophistiquées avec un chromogène (CISH) ou un marqueur fluorescent (FISH), pour identifier, dans chaque cellule, la présence et le nombre de copies d'un segment chromosomique : on recherche polysomie, monosomie, délétion, amplification, translocation de certains gènes à valeur diagnostique ou pronostique dans certaines tumeurs.

Par exemple :

→ La recherche d'une amplification (augmentation du nombre de copies) du gène HER2, à l'origine d'une protéine antigénique dans le cancer du sein ou de l'estomac pour poser l'indication d'un traitement par Herceptine (anti-protéine-HER2).

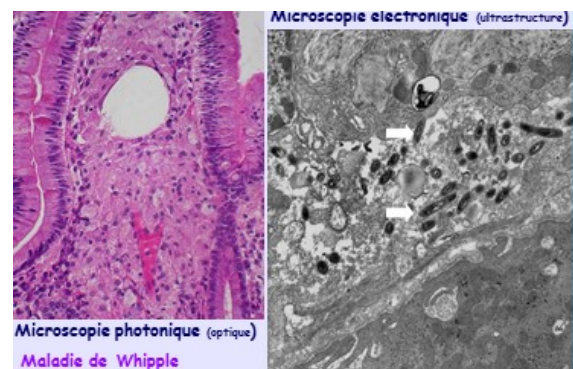
→ La recherche d'ARN du virus EBV : marquage nucléaire intense montrant de l'ARN du virus EBV, qui provoque le carcinome nasopharyngien

Avec les techniques de biologie moléculaire non morphologiques, on recherche la clonalité, la perte d'hétérozygotie, les mutations, etc. Mais avant, on effectue une sélection des lésions pour la biologie moléculaire qui n'est pas in situ par microdissection : on envoie alors les prélèvements contenant des lésions sélectionnées par les médecins anatomo-pathologistes aux laboratoires de biologie moléculaire. Si on sélectionne une lésion qui est normale, l'analyse moléculaire ne sera pas bonne. Le rôle de l'anatomo-pathologiste est fondamental : il doit repérer et sélectionner les zones d'intérêt pour les études moléculaires qui ne sont pas in situ.

#### E) Microscope électronique

Le microscope électronique permet d'étudier l'ultrastructure des tissus (organites, maladies de surcharges), d'agents pathogènes intra ou extracellulaire (virus) car les grossissements sont puissants. Cette technique est longue et coûteuse : on prélève de petits fragments de 1 à 2mm, on fait des fixations spéciales avec de la glutaraldéhyde, des inclusions en résine, des coupes avec des couteaux en diamant : l'ultramicrotome qui produit des coupes très fines de 50nm. Les indications sont très limitées : maladies de surcharges, pathologie neuromusculaire ou rénale mais aussi en recherche. On peut faire un examen immunoélectronique : on applique un anticorps in situ et on regarde où se fait la liaison Ac-Ag. Le microscope électronique est plus grand que le microscope optique.

Ex : maladie de Whipple en ME où l'on met en évidence des agents pathogènes (*Tropheryma whipplei*) à l'intérieur de la cellule.



## V – Risques en anatomo-pathologie et autopsie

### 1) Risques infectieux

Ce sont des risques inhérents à la manipulation de prélèvements qui sont frais (non-fixés) ou liquides. On a un risque de contamination à :

- Virus : hépatite B, C, VIH
- Bactéries : tuberculose
- Agents transmissibles non conventionnels (ATNC) : Creutzfeldt-Jakob (même fixés)

Ces risques nécessitent des précautions à l'examen et au prélèvement.

### 2) Risques toxiques

Tous les produits utilisés sont toxiques et nécessite des conditions de manipulation précises et surveillées entraînant des risques :

- Personnels : Fixateurs (le formol est toxique, cancérigène)  
Réactifs  
Solvant (toluène)
- Environnementaux : élimination des déchets

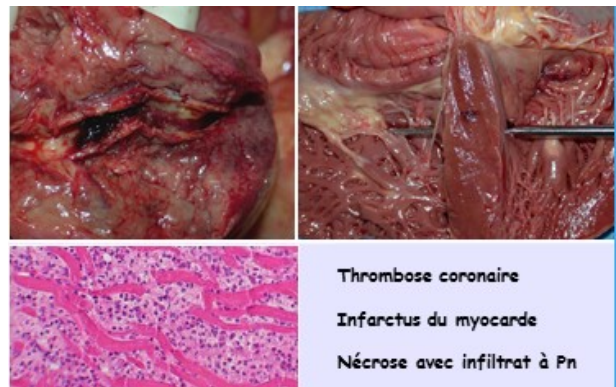
### 3) Autopsie/nécropsie

Les autopsies à visée scientifique ne sont presque plus réalisées au sein de l'assistance-publique pour des raisons essentiellement de coûts. Ils sont faits après avoir interrogé le registre des refus et avoir prévenu la famille. Cet examen macroscopique et histologique de tous les viscères précise les lésions responsables des symptômes, établit les causes de la mort et éventuellement juge des effets des traitements reçus. Il permet de vérifier un diagnostic clinique ou des hypothèses diagnostiques, d'apprécier l'extension de la maladie et est source de données épidémiologiques. Il est effectué à la demande du clinicien car il n'a pas réponses aux questions posées du vivant du malade et uniquement dans ces indications.

Cet examen diffère de l'autopsie médico-légale faite par le médecin légiste dans un contexte différent : aucune opposition n'est possible et c'est considéré comme un « don du corps à la science »

Ex : Homme de 55 ans avec antécédents d'HTA traitée. Douleur abdominale intense, à début brutal, sans facteur déclenchant. Choc et mort subite aux admissions. Demande des cliniciens qui ont reçu ce patient pour savoir s'ils n'auraient pas pu faire autre chose, pourquoi, pour les patients suivant, etc.

Après autopsie, au niveau du cœur, on voit une artère coronaire thrombosée, entraînant un infarctus du myocarde, le septum est nécrosé. C'est un infarctus du myocarde secondaire à une thrombose avec une perforation du cœur, confirmé par l'examen histologie : nécrose des fibres musculaires et la réaction inflammatoire.





## **Conclusion**

L'examen anatomo-pathologique est un examen de diagnostic permettant d'avoir des informations sur la nature des lésions prélevées.

L'anatomo-pathologiste ne voit pas le malade et le clinicien doit renseigner les renseignements cliniques : état civil, antécédents, prises médicamenteuses, symptomatologie actuelle, biologie, imagerie, endoscopie, etc. Ces renseignements sont l'équivalent de l'interrogatoire clinique. L'anatomo-pathologiste voit des lésions cellulaires et tissulaires correspondant aux signes cliniques perçus par le clinicien pendant l'examen.

Ensuite, ces lésions sont interprétées, ce n'est pas une mesure exacte. Cette interprétation donne lieu à un diagnostic ou des hypothèses diagnostiques avec des indications sur le potentiel évolutif des lésions et des données sur le pronostic et l'efficacité thérapeutique d'un traitement. Ces données se retrouvent dans le compte-rendu anatomo-pathologique qui correspond aux éléments du « dossier patient ».

La confrontation pluridisciplinaire anatomo-clinique permet la prise en charge thérapeutique du patient. La qualité de la prise en charge du prélèvement et la précision du diagnostique sont étroitement liées à la communication entre clinicien et médecin ACP.

Il faut connaître :

- examen histologique : principales étapes techniques entre la réalisation du prélèvement et l'examen de la lame au microscope
- biopsie : définition, principaux types de biopsies à l'aide de quelques exemples
- examen cytologique : définition, principales étapes techniques, citer quelques indications à l'aide d'exemples
- examen extemporané : principales étapes techniques, citer quelques indications à l'aide d'exemples.

