

Cours n°1 : Introduction à l'anatomie et cytologie pathologique (ACP)

- Ce cours comporte beaucoup de photos, nous vous conseillons donc de vous référer au diapo de la prof ou à cette frappe sur l'aecdr pour les avoir en couleur et en meilleure qualité.
- A savoir : le circuit de prélèvement ++, l'organe présent sur des photos de prélèvements, les colorants de base, quels cancers on doit systématiquement congeler.
- Examen: /20 : Examen terminal de 1H : 15 QCM ou QROC: 1 points: /15
Contrôle continu pendant le TD en amphi: 5 photos histo avec QCM : /5

Un carcinome malpighien de la gencive:

1. est une tumeur bénigne
2. peut se développer sur des lésions dysplasiques pré-existantes
3. est favorisé par la prise prolongée d'alcool
4. est à un risque métastatique
5. nécessite une simple surveillance
6. la taille est un facteur pronostique

Réponses : 1,2,3,4,6

Carcinome = tumeur épithéliale maligne

- Se développe souvent sur des lésions pré-existantes et la dysplasie est un état préneoplasique
- Alcool et tabac = risques de cancer pour la sphère orale
- Tumeur maligne = risque de métastases
- Ne nécessite pas une simple surveillance, il faut l'enlever ou radiothérapie
- La taille est bien un facteur pronostic

Au CHU de Rennes il y a :

Une 20aine de services avec blocs opératoires (jour) et des blocs opératoires de nuit (urgences et transplantation).

Un service d'anapath à pontchaillou avec une antenne à l'hôpital sud pour les examens extemporanés

- 40 000 dossiers/ans enregistrés
- exemple surveillance d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin : 40 pots mais 1 dossier patient. Donc 40 000 dossiers ne veut pas dire 40 000 prélèvements ou pots, c'est beaucoup plus.
- Ca représente à peu près 250 000 blocs de paraffine à couper, en sachant qu'un bloc de paraffine donne en moyenne 5 lames colorées. Donc il faut multiplier 250 000 par 5 pour avoir le nombre de lames dans le service.
- Il y a un professeur, 3 maîtres de conférence, 4 praticiens hospitaliers, 2 mi-temps, 2 assistants hospitalo-universitaires, 4 internes + 19 techniciens, 5 secrétaires, 3 aides laboratoires.

I- Introduction

Définition de l'ACP :

C'est l'examen microscopique et l'analyse histologique des **cellules** (dans les prélèvements liquidiens ou les frottis cervicaux-vaginaux ou anaux) et/ou des **tissus** (sur tumeurs par ex) en vue d'un diagnostic pour une prise en charge thérapeutique du patient. Dès qu'on a un **prélèvement humain**, il va en anapath pour faire le diagnostic.

Le rôle de l'anapath est d'établir le **diagnostic** de la maladie à partir de prélèvements humains, tissus, frottis, liquides etc. Dans la moitié des cas, le clinicien ne connaît pas la maladie et donc envoie le prélèvement pour que le diagnostic soit fait. Dans l'autre moitié, le clinicien suspecte la pathologie mais l'anapath peut aussi lui donner des renseignements sur la gravité et le pronostic.

L'anapath a aussi un rôle dans le **suivi** (pour les transplantations d'organes: prélèvements au moment du diagnostic, puis prélèvements à vie, ou maladies chroniques pour suivre l'évolution de la maladie) et la **surveillance** d'un traitement et/ou dans le **choix d'un traitement**.

Il y a un certains nombres de critères pronostiques, par exemple :

- pour la cancéro: la taille tumorale, l'extension de la tumeur dans l'organe ou à l'extérieur
- pour les transplantations : présence de fibrose (mauvais pronostic) ou non, si maladie auto-immune présence d'inflammation ou non

Il y a également des critères thérapeutiques : si une tumeur est localement très avancée, ce n'est pas la peine de faire de la chirurgie on préférera la radiothérapie, chimiothérapie ou une thérapie ciblée.

Pour la cancérologie, on peut déterminer des biomarqueurs dans les tumeurs qui permettent de donner ou non un traitement.

Dans le cancer du sein ou de la prostate (cancers hormono-dépendants), on recherche si la tumeur exprime les récepteurs aux hormones sexuelles: oestrogène et progestérone pour le cancer du sein . Si c'est le cas, on peut proposer une hormonothérapie.

Il y a un troisième marqueur qui est l'HER2. S'il est surexprimé on peut donner de l'herceptin. Quand il y a les 3 marqueurs qui sont exprimés c'est une tumeur de bon pronostic. Mais il existe les cancers du sein triple négatif: aucun traitement, la patiente n'a aucune chance.

Un biomarqueurs de cause de la maladie : BrcA. S'il y a une mutation BrcA il y a quasiment 100% de risque de développer un cancer du sein ou de la prostate.

L'anapath a donc un rôle **de diagnostic, de pronostic, de choix de thérapeutique** mais aussi de recherche. Ce n'est ni un rôle de recherche clinique, ni fondamental, mais c'est entre les deux : un rôle **de recherche translationnelle** => Il y a une interface entre fondamentalistes et cliniciens.

II- Les rôles du pathologiste

- Diagnostique
- Pronostique
- Thérapeutique
- Recherche

III- Types de prélèvements

- **Cytologie pathologique** (à partir de cellules) : prélèvements de **liquides**, exemples : prélèvement de ponction d'ascite, d'épanchement pleural.. et aussi les frottis tels que les frottis cervico-vaginaux, frottis anaux chez les patients à risques (immunodéprimés, SIDA ou rapports sexuels multiples.)
- **Anatomie pathologique** (histologie = prélèvements tissulaires) :
 - **Biopsies** : prélèvements tissulaires de 2 à 3 mm. Les plus petites sont les biopsies broncho-pulmonaire environ 1- 2mm et les plus grosses sont les biopsies digestives (colon).
 - **Résection** (petits copeaux): souvent résections de prostate, de vessie ou chez la femme de myomes (4 à 5 grammes).
 - **Petites pièces opératoires** : Taille d'un appendice, d'une vésicule biliaire
 - **Grosses pièces opératoires** : Côlon, foie, rate, coeur, poumon, cerveau..

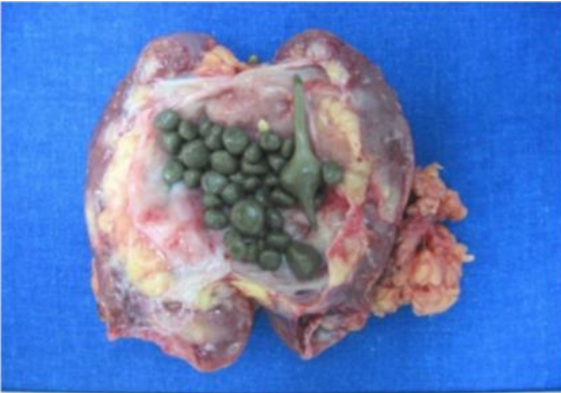
IV-Photos de prélèvements :



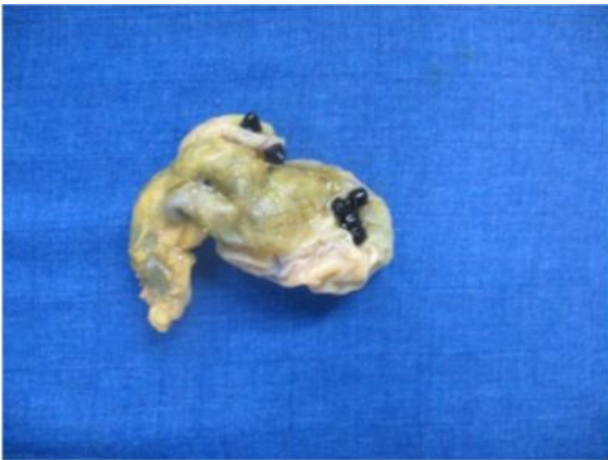
Prélèvements broncho pulmonaires.



Appendice avec abcès appendiculaire



Rein avec calculs : présence de lithiases, coliques néphrétiques ce qui entraîne des douleurs très importantes. Normalement les calculs sont très petits (de l'ordre du μm) alors qu'ici ils sont beaucoup plus gros (c'est très rare de voir cela) donc rein non fonctionnel.



Vésicule biliaire avec des calculs

La vésicule biliaire est opérée dans 90% des cas car il y a des calculs. L'inflammation de la vésicule biliaire est traitée par ATB.



Copeaux de résection

Un des signes du cancer du côlon est la constipation.



Mandibulectomie partielle

Tumeur de la gencive entre les dents.

V- Pathologies étudiées

On peut tout étudier, mais c'est plus difficile pour étudier les bactéries car en anapath on ne les voit pas forcément quand elles sont trop petites. Il faudra donc faire un prélèvement bactériologique qui sera envoyé en bactériologie. En revanche les virus sont visibles dans un tissu. Globalement, ils étudient soit la pathologie non tumorale soit la pathologie tumorale.

- Pathologie **dégénérative des cellules** : tissus vieux, destruction du réseau élastosique, anomalie du collagène...
- Pathologie des **métabolites** (de surcharge): lipides (foie OH, dyslipidose), glucides (glycogénose : diabète), protides (purines: goutte), hème (porphyrie, bile), minéraux (fer, calcium) pigments (mélanine)... Pour pratiquement tous ces dépôts, il y a une coloration qui permet de les mettre en évidence (Ex pour le fer : coloration de perls).
- Pathologie des **substances conjonctives** : collagène: fibrose, fibres élastiques, amylose... On n'a pas de traitement contre la fibrose : au stade de cirrhose on peut traiter le foie mais pas au stade de fibrose
- Pathologie **circulatoire et vasculaire** : pathologies de dépôt (athérosclérose) et maladies auto-immunes → inflammation des vaisseaux puis infarctus..
- Pathologies de **l'inflammation** : pathologie inflammatoire (MICI), pathologies auto immunes (hépatite auto-immune, infection (virale, BK...))
- Pathologie de la **multiplication et de la différenciation cellulaire** : Pendant notre vie foetale et embryonnaire, chacune de nos cellules-souches est programmée pour se différencier en un certain type de cellule, et il peut y avoir des anomalies de ces cellules. Par ex, des patients ont des organes au niveau desquels il y a une métaplasie (=tissu anormalement présent dans un organe dans lequel il ne devrait pas être présent, la muqueuse est remplacée par une muqueuse d'un autre organe, ex: endométriose), des dysplasies, aplasies, métaplasies, atrophies, vieillissement...
- **Néoplasie** bénigne et maligne : 50% de l'activité de l'anapath
- **Dysgénèse** : malformations, hamartome, vestiges, ectopie, lésion blastomateuse... Plutôt pathologies de l'enfant et malformations qui donnent ou non une naissance ou entraînent un avortement.

Aussi du travail sur les **patients décédés** :

- **foetopathologie**, cela correspond aux autopsies des foetus (interruption médicale de grossesse, fausses couches, mort subite du nourrisson), aux autopsies à visée scientifique (décédé à l'hôpital sans la cause, le clinicien demande une autopsie), ou de suspicion de la maladie à prions, Creutzfeld-Jacob (autopsie cérébrale). Le CHU de Rennes est le seul centre à faire des autopsies, c'est le centre de référence dans l'Ouest pour les suspicions de maladies à Prions.

La recherche de mutations chez les parents pourrait éviter les autopsies de foetus mais pour le moment on en fait quand même.

La première cause de décès dans les pays occidentaux est le cancer. Avant c'était les maladies cardio. La première cause de décès chez l'homme est le cancer (surtout le cancer du poumon). Chez la femme, ce sont les accidents vasculaires cérébraux depuis 2019 (lié à la prise d'oestrogénostatifs, tabac, hypertension etc...) alors qu'avant c'était le cancer.

VI- Les différentes étapes à de prise en charge d'un prélèvement (à connaître)

Quand il y a un problème il faut savoir : qui, comment, pourquoi, à quelle heure et où

1. Réception et enregistrement du prélèvement. Le prélèvement arrive toujours dans le service avec un bon de prescription et il est dans un tube ou un pot. Il arrive à la réception où il va être enregistré : renseignements cliniques, siège, nature du prélèvement, coordonnées, heure et jour du prélèvement et enfin étiquette du patient et celle du service où il est prélevé. Les aides laboratoires enregistrent le prélèvement, elles mettent un tampon avec le jour et l'heure à laquelle il est arrivé dans le service et elles lui donnent un **numéro anapath** (Ex: 10/88 pour le 88 ème prélèvement envoyé de l'année 2010, on met d'abord l'année). Les anapath traitent par an environ 45000 dossiers (1 dossier par patient) sachant qu'un dossier peut contenir plusieurs prélèvements.

Bon mal rempli : il n'y a pas tous les renseignements. pas le nom du préleveur, on ne sait pas d'où ça vient etc ..On sait que c'est un prélèvement procto donc au niveau de la marge anale.

2. Congélation (tumorothèque sanitaire ou de recherche) puis **fixation au formol** à 4% (paraformaldéhyde : classé cancérigène depuis 07/2007) de quelques heures à 18H.

A SAVOIR

Les tumeurs à **congeler systématiquement** à visée sanitaire (INCa, plan cancer) sont :

- Toutes les suspicions de tumeurs pédiatriques
- Sarcomes (tissus mous)
- Lymphomes

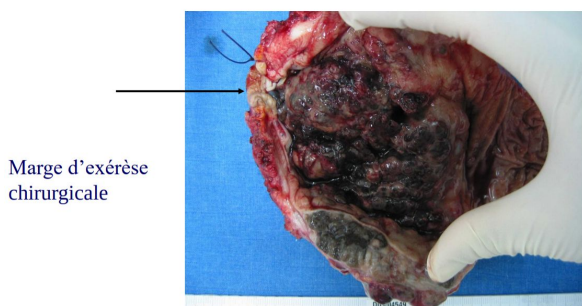
On les congèle car ces tumeurs nécessitent une analyse de gènes qu'il est difficile d'étudier à partir d'un bloc de paraffine. Actuellement, les chercheurs sont capables d'isoler l'ADN à partir de bloc de paraffine et de retrouver les mutations. On ne congèle donc pas toutes les tumeurs, mais seulement celles pour lesquels l'étude de l'ADN est plus complexe.

3. Examen extemporané (fait en per-opératoire) : Toujours demandé par le **chirurgien**. Examen anatomopathologique qui permet de donner un résultat au chirurgien en 15 minutes. **L'acte du chirurgien dépendra du résultat de cet examen**: le chirurgien a besoin d'un diagnostic sur une question précise pour savoir comment il va orienter son geste chirurgical. Cet examen se fait toujours sur un prélèvement frais.

La technique d'examen extemporané dure à peu près 15 minutes, mais les chirurgiens commencent à opérer à 8 h du matin, ils ont tous besoin d'une extemporanée entre 11h et 12h30. Donc quand 3 extempos arrivent en même temps, le patient correspondant au dernier prélèvement qui arrive se prend une demi-heure d'anesthésie en plus. Il faut donc prévenir les chirurgiens s'il y a un moment d'attente.

Exemples d'indications d'extemporanés:

- Marge d'exérèse chirurgicale après prélèvement d'une tumeur, pour savoir si le chirurgien a bien tout enlevé: représentent la majorité des demandes d'examen extemporanés



Ex: Chirurgien qui fait une amputation pour un cancer du bas rectum, on voit la tumeur et la zone où il a coupé = zone d'exérèse chirurgicale. Ici, la zone est très proche de la tumeur, le chirurgien n'est donc pas sûr que sa limite soit en zone saine. Il demande donc un examen sur la marge chirurgicale.

Comme le chirurgien demande une réponse dans les 15-20 minutes, on ne peut pas fixer le prélèvement dans le formol (lame prête le lendemain matin) car pas le temps. On fait un prélèvement sur la **marge chirurgicale**, on la met dans un cryostat (à -20°C), le prélèvement va être congelé (cela prend 3-4 min), puis mis sur un plot et coupé. Les coupes congelées sont mises sur une lame et colorées très rapidement avec un Hémalin éosine rapide.

- Si la marge n'est pas tumorale: le chirurgien referme le patient
- Si la marge est tumorale: le seul geste possible ici, car il est très bas au niveau du rectum et proche de l'anus, est de faire une amputation abdomino-périnéale cad d'enlever l'anus en même temps. Le patient aura une poche à vie.

Quand on fait une marge chirurgicale, il faut vraiment être sûr car si on dit que la marge est positive, le chirurgien doit enlever quelque chose en plus. Par exemple dans le cas d'une lobectomie pulmonaire, si on dit que sa marge est positive sur le lobe pulmonaire, le chirurgien va enlever tout le poumon.

En cas de doute, il faut aussi prévenir le chirurgien: il referme, quitte à ré-opérer plus tard au lieu d'enlever un bout d'organe et de s'être trompé.

- Curage ganglionnaire avant chirurgie carcinologique

Permet de savoir si le ganglion de la sphère du cancer qui va être opéré est métastatique ou non. Par exemple dans les cancers de la thyroïde, si le ganglion est positif le chirurgien enlève toute la graisse cervicale (embêtant à cause de tous les nerfs qui y passent)

- Nature de la lésion (souvent contexte d'urgence ou découverte préopératoire, pulpectomie..)

Quelqu'un a une grosse masse, on ne sait pas si elle est tumorale ou pas. Les radiologues ont essayé de biopsier plusieurs fois mais soit la masse est trop profonde, soit elle est mal positionnée. Dans ce cas ils sont obligés d'ouvrir le patient et de demander en extemporané si c'est tumoral ou non.

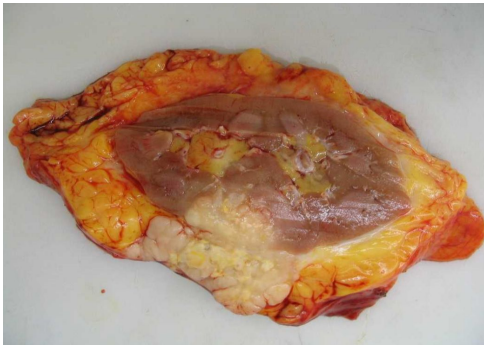
Ex: patient avec une grosse lésion colique, il a une endoscopie 2-3 fois, la lésion est tellement sténosante qu'ils n'arrivent pas à aller au centre. Dans ce cas on ouvre et on fait un prélèvement en plein dans la lésion. Si c'est juste inflammatoire, ils enlèvent juste une petite zone de quelques cm, si c'est tumoral ils peuvent enlever un gros bout de colon.

- Être sûr d'être dans la tumeur d'une masse difficile à aborder : Parfois ils ont un doute et veulent savoir s'ils ont bien enlevé toute la tumeur: ils demandent de vérifier que la tumeur est bien sur la pièce opératoire.

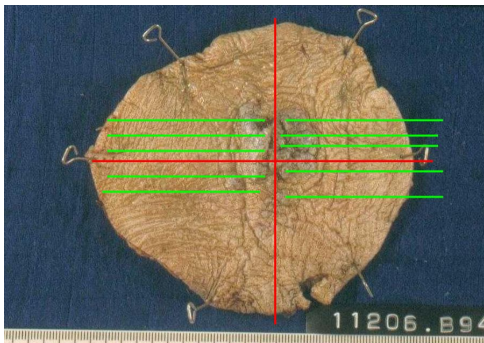
Une fois qu'on a étudié le prélèvement frais (avec éventuellement une congélation pour l'inCa/un examen extemporané), on fixe le prélèvement. Le fixateur universel est le **paraformaldéhyde = formol**. Ce liquide incolore permet de durcir le tissu de manière à ce que le lendemain les anapath puissent faire des prélèvements sur des organes durs. On fixe tous les prélèvements au minimum 12 heures.

Le lendemain, on fait des prélèvements sur les organes ou les tissus. Pour les biopsies, on les met directement en bloc de paraffine car ce sont de petits prélèvements. Sur les grandes pièces opératoires on est obligé de faire des prélèvements.

4. Macroscopie : protocoles/fiches standardisées

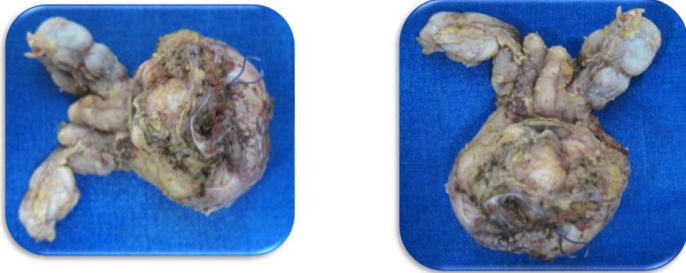


C'est un cancer du rein, avec autour la graisse et une tumeur qui envahit la graisse péri rénale, elle est déjà très étendue.



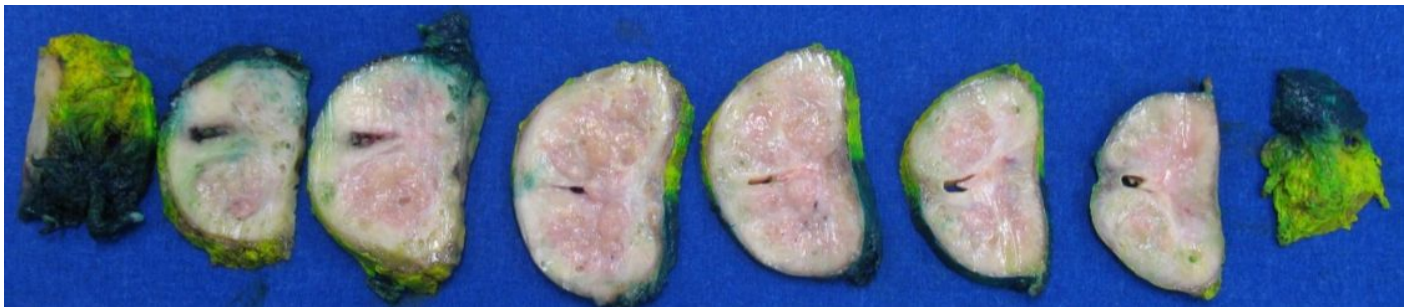
Résection d'un mélanome malin, la peau est ridée (souvent peau de pêcheur ou d'agriculteur qui sont très exposés au UV), le mélanome malin est une tumeur très agressive, il faut donc laisser plusieurs cm de marge chirurgicale. Ici on fait une inclusion de la quasi totalité du mélanome et on vérifie les marges chirurgicales les plus proches.

Biopsies de prostate positives:



La prostate est en bas de la vessie et permet à la vessie de se contracter, et l'urètre y passe. Donc sans prostate on a des fuites urinaires.

Quand les urologues décident d'opérer la prostate, elle est toujours enlevée en totalité avec les vésicules séminales et une partie des canaux déférents (qui véhiculent le sperme) car on ne peut pas faire de résections segmentaires. Les anatopath incluent toute la prostate pour avoir la totalité des marges chirurgicales. Si le chirurgien est passé dans la tumeur, en plus de la chirurgie le patient aura une radiothérapie, il sera incontinent et impuissant.



Voici une prostate une fois qu'elle est coupée en tranches: on a l'urètre prostatique qui fait passer les urines engainé dans la prostate, et on voit le cancer de prostate. Quand on lui enlève la prostate, le patient devient impuissant car dans la graisse on trouve tous les paquets vasculo-nerveux qui permettent en partie l'érection. En cas de cancer, les urologues sont obligés d'enlever ce paquet vasculo-nerveux.

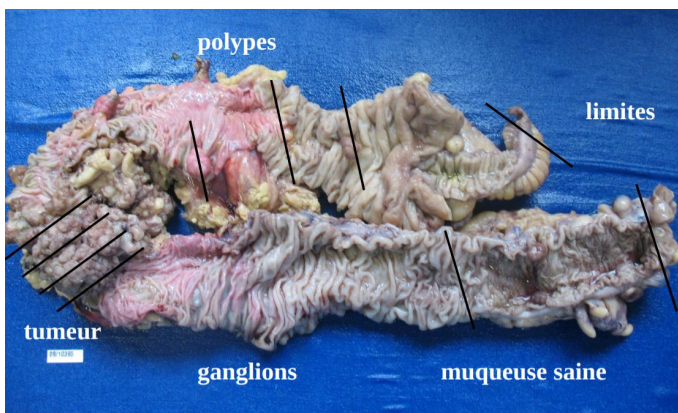
Ici, l'IRM montrait que la tumeur était très localisée à droite et ne s'étendait pas aux paquets vasculo-nerveux donc l'urologue a pris le risque de préserver le paquet vasculo-nerveux à gauche.

Une fois qu'on a fait les prélèvements, on les met dans des blocs (ou cassettes). Il y a deux types de blocs:

- petits blocs d'à peu près 2 cm
- gros blocs de 6-7 cm



Pour la prostate on met dans de très grands blocs qu'on refixe dans du formol. Quelques heures après, on verse dans ces blocs de la paraffine liquide chaude, qu'on refroidit sur des plaques réfrigérantes pour que cela se fige à la manière de la cire de bougie. Les blocs de paraffine sont ensuite coupés au microtome (coupes de 3 microns d'épaisseur) et les coupes sont ensuite mises sur des lames qui sont colorées par une coloration standard: l'**HES = hémalin eosine safran**, et éventuellement par des colorations spécifiques. Ces lames sont ensuite reçues par les anapath qui les regardent au microscope.



Cancer du colon: masse bourgeonnante qui occupe tout le diamètre (=lumière) du colon. Le patient est en occlusion et aura du sang dans les selles. La tumeur est localisée de telle manière que le chirurgien est obligé d'enlever un bout d'intestin et puis un gros bout de colon. Le colon reçu sera fixé dans du formol et coupé le lendemain matin.

Que fait-on comme prélèvement?

- Toujours les limites d'exérèse chirurgicale pour savoir si il passe en zone saine
- Prélèvements sur la tumeur: on fait minimum 1 prélèvement /cm de tumeur (tumeur de 5 cm = 5 prélèvements), avec des zones stratégiques (graisse, zones nécrosées, ganglions pour la recherche de métastases ganglionnaires)
- On vérifie le reste du colon: on fait des prélèvements sur les polypes (petites boules)

Chaque personne à 50 ans (puis après tous les 2 ans) reçoit un test par la sécurité sociale qui permet de mettre dans un boite des selles. Un immunotest permet de voir s'il y a des produits de dégradation= du sang dans les selles. Si le test est positif (sang dans les selles), on a le droit à une colonoscopie.

- Il n'y a que 40% des patients ayant un test positif qui ont un cancer ou des polypes

Le test de dépistage n'est pas pour rechercher un cancer du colon (c'est trop tard), c'est pour rechercher les lésions avant le cancer, lésions pré-néoplasiques (polypes, qui évoluent ensuite en cancer).

Pour le frottis chez la femme, c'est la même chose, on recherche une lésion pré-néoplasique, une lésion dysplasique.

Globalement, les cancers mettent environ 10 ans à se développer et l'âge moyen d'apparition des cancers est de 65 ans: donc on fait les dépistage à partir de 50 ans. Tous les dépistages de masse sont à partir de 50 ans (=10 ans avant l'apparition d'un cancer)

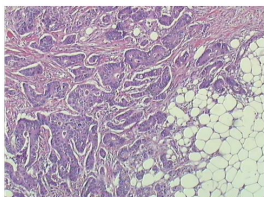
- Sauf chez la femme: se fait à partir du moment où les femmes ont une vie sexuelle active (vers 25 ans).

Sur une pièce opératoire, il faut prélever les **ganglions**.

Est-ce qu'on prélève seulement les ganglions qui semblent métastatiques (très durs à la palpation) ou tous les ganglions?

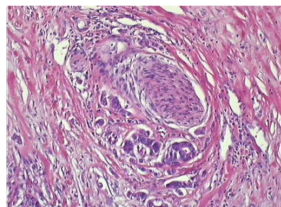
On prélève **tous les ganglions**, car en cas de micrométastase on ne la sentira pas. Il faut une analyse microscopique.

5. Histologie : on étudie la structure des tissus à un niveau microscopique

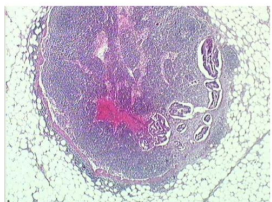


ADK

Coupes histologiques du colon: adénocarcinome



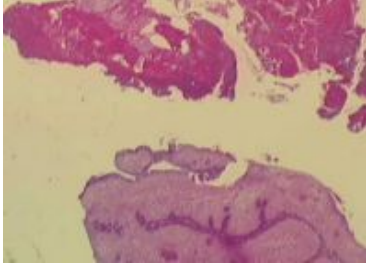
Le cancer va dans la graisse et il y a des glandes cancéreuses sur le nerf: le patient a donc mal, car ses nerfs sont engainés par la tumeur. On a prélevé les ganglions lymphatiques et on voit qu'il y a une métastase ganglionnaire.



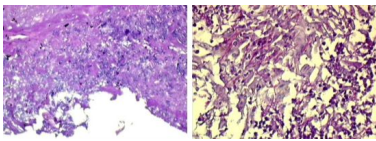
Coloration HES

Un cancer du rein ne fait pas mal sauf si la tumeur comprime un organe voisin. Le cancer du pancréas et le cancer le plus douloureux car très vascularisé.

Ex: Patient alcoolo-tabagique ayant consulté son gastro entérologue car quand il mangeait il avait du mal à avaler, état dentaire cata, TABAC, ALCOOL + lambeau blanchâtre qui se détache de la muqueuse malpighienne. On fait un prélèvement (biopsie de l'oesophage), envoyé en anapath. A l'endoscopie il découvre de gros dépôts blanchâtres, au niveau de l'oesophage et de la bouche. Voici les prélèvements étudiés.

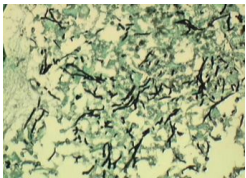


Les zones rouges anormales observées sur les lames ne sont pas cellulaires, donc ce n'est pas un cancer. Infection = candidose + inflammation. L'oesophage est ulcéré (mais pas cancéreux). Quand on a ce type de lésion ulcérée dans un oesophage chez un patient qui a une dysphagie, il faut vérifier que ce n'est pas un cancer ou une infection.

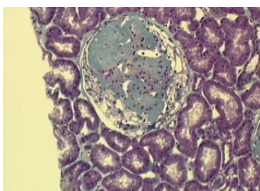


On utilise une coloration spéciale dite PAS pour rechercher les champignons. On les voit sur les lames sous forme de filaments ou de ronds = spores.

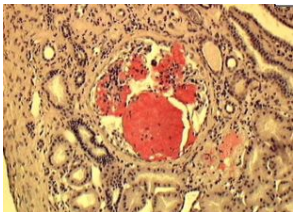
6. La coloration de base, standard de toute les lames est la **coloration HES** (hémalin (bleu) - eosine (rouge) - safran (jaune orange)), il y a aussi la **coloration PAS et Grocott**. Ces deux dernières mettent en évidence les champignons (candidas) : beaucoup utilisées pour les prélèvements en bouche. Trois colorations à retenir.



Grocott



Biopsie rénale avec un glomérule (sert à filtrer le sang). Patient avec protéinurie : biopsie du rein, son glomérule a de gros dépôts verdâtres. On suspecte une amylose (maladie rare qui se caractérise par la présence de dépôts de protéines insolubles dans les tissus).



→ dans ce cas on fait une coloration très spécifique de l'amylose, avec du rouge congo. Ensuite il faut la typer (amylose liée à une maladie inflammatoire chronique, à un cancer, etc..)

7. Techniques complémentaires

Rôle : Diagnostic, pronostic et déterminer la **prise en charge** thérapeutique adaptée.

Les deux techniques (immunohistochimie et immunofluorescence) ont le même rôle et permettent de rechercher l'expression de protéines (de biomarqueurs) dans un tissu. Un tissu va exprimer un antigène, et on applique sur des coupes:

- en paraffine (pour l'immunohistochimie)
- congelées (pour l'immunofluorescence)

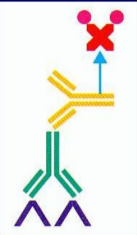
un anticorps dirigé contre l'antigène et la fixation Ac-Ag (si l'Ag est présent) va être révélée par une coloration

- brune (pour l'immunohistochimie)
- vert fluo (pour l'immunofluorescence)

L'immunohistochimie : toutes les cellules expriment à leur surface des Ag. Quand on a des cancers, des virus etc, ils ont à leur surface des Ag spécifiques qu'on peut mettre en évidence grâce à des Ac spécifiques dirigés contre ces Ag, couplés à des colorants. Lorsque la lésion se fait, il y a une révélation chromogénique. Cela est réalisé sur de ces coupes incluses en **paraffine** surtout. La coloration sera souvent brune.

Immunohistochimie +++

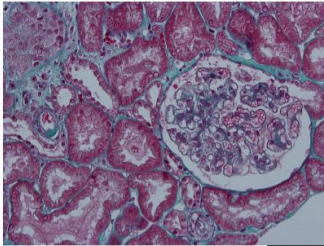
- Trois étapes
 - incubation avec l'anticorps primaire
 - incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé
 - incubation avec le complexe streptavidine biotine sur lequel sont fixées les peroxydases



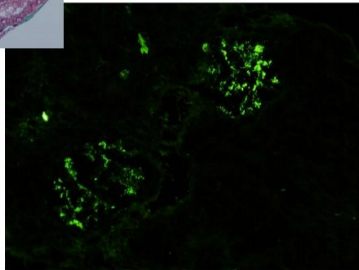
L'immunofluorescence : C'est une technique d'immunomarquage, on utilise un Ac dirigé contre la molécule recherchée, appelée Ag. Cet Ac est couplé à un fluorochrome. C'est utilisé pour mettre en évidence les immunoglobulines par exemple et cela fonctionne sur des coupes **congelées**. La coloration sera vert fluo.

NB: Les bandelettes urinaires sont les seuls examens qui permettent de savoir si on a une protéinurie ou une hématurie

Exemple d'utilisation de l'immunofluorescence : Biopsie rénale suite à une hématurie (sang dans les urines). Le prélèvement est ensuite congelé puis on réalise une immunofluorescence dessus qui se traduit par une image fluorescente.



Immunofluorescence



Ici, on suspecte une glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'IgA. Il y a de l'IgA qui se fixe anormalement dans nos glomérules. On fait un prélèvement en congélation pour lequel on fait des coupes congelées, et on applique un certain nombre d'Ac dont un Ac dirigé contre l'IgA. Si on a de l'IgA dans nos glomérules, la fixation de l'Ac anti-IgA sur l'IgA est révélée par un fluorochrome vert (c'est le cas ici).

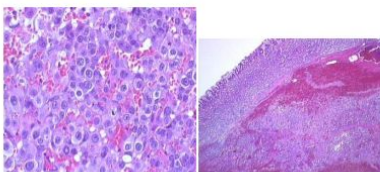
Exemple d'utilisation de l'immunohistochimie: Patient de 18 ans arrivé aux urgences pour un malaise en cours, sans ATCD.

Bilan biologique :

- 4g/dl d'hémoglobine (normal : 12g/dl): il saigne quelque part
- Selles noires
- Fatigue
- Perte de poids très importante (18kg en quelques mois)
- Maelana (saignements dans le tube digestif)

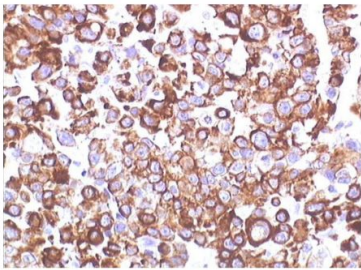
Chez un patient jeune qui saigne, la 1er chose qu'on fait est une endoscopie haute et basse (on vérifie tout le tube digestif): on trouve une tumeur noirâtre de la face postérieure du fundus qui saigne, et se mobilise en masse dans l'estomac suite à l'endoscopie haute. Biopsie envoyée en anapath en extemporanée : en anapath on détermine que c'est une tumeur maligne

Le patient est jeune, ils enlèvent donc juste la tumeur (gastrectomie partielle) et non tout l'estomac (gastrectomie totale). On fait des lames de la tumeur et on l'analyse en anapath à nouveau. La tumeur est agressive, indifférenciée (on ne sait pas si c'est une tumeur épithéliale gastrique, un lymphome, un sarcome, etc) et ne ressemble à aucun organe donc on ne sait pas dire d'où elle vient.



Coupe de la tumeur

Tumeur indifférenciée: on sait que c'est dû au grade donc on utilise l'immunohistochimie. On utilise des Ac orientés contre des Ag afin de mieux classer la tumeur. Quand on a une tumeur peu différenciée, on fait une batterie d'Ac: on fait des Ac dirigés contre tous les sous-types possibles de lymphomes, contre les mélanomes, les carcinomes, les sarcomes, etc... On cherche donc des Ag exprimés par les cellules tumorales par immunohistochimie.



Coupe de la tumeur en immunohistochimie avec Ac dirigé contre Ag KL1.

On teste les :

- Marqueurs mélanomes : négatifs
- Marqueurs lymphoïdes : négatifs
- Marqueurs endocrines : négatifs
- CD117 et CD34 : négatifs
- KL1 et CK22 : positifs

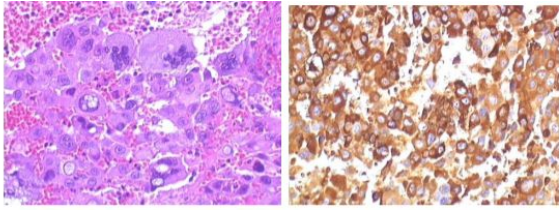
Ici, Les marqueurs épithéliaux sont les seuls positifs donc on a un carcinome peu différencié (éventuellement adénocarcinome de l'estomac (car l'estomac c'est de l'épithélium)).

Un **carcinome** est une tumeur qui est née à partir de structures épithéliales (revêtement cutané, muqueuse gastrique). On conclut donc que c'est un carcinome peu différencié de haut grade, en pensant que c'est sûrement un carcinome de l'estomac (comme le patient est jeune, il faudrait rechercher quelque chose de génétique).

Le patient part au centre anticancéreux. Il est examiné nu par l'oncologue qui remarque une énorme tumeur testiculaire qui le patient n'avait pas osé montrer. Cela faisait 2 ans que le patient portait des baggys car il n'arrivait plus à porter des pantalons à cause de son testicule qui avait énormément grossi.

On se demande donc qui a métastasé à l'autre: est-ce que c'est un cancer du testicule qui a métastasé à l'estomac ou l'inverse?

On reprend le prélèvement, on ré-inclut la tumeur en totalité et sur un bloc de paraffine on retrouve des grandes cellules avec plein de noyaux. Ce sont des cellules foetales syncytiotrophoblastiques qui sécrètent de la B-HCG (comme les femmes enceintes). C'était donc une tumeur testiculaire germinale embryonnaire qui a métastasé à l'estomac = carcinome embryonnaire. Le patient a développé plein de métastases et est décédé. Conseil : si on a un testicule qui grossit, il faut le montrer...



Immunohistochimie avec Ac anti B-HCG sur la tumeur testiculaire.

Attention: c'est le cancer numéro 1, avec le lymphome, du sujet jeune.

L'**immunohistochimie** permet donc de faire un diagnostic quand on a quelque chose de très peu différencié.

A côté de l'immunohistochimie, on peut demander à d'autres services de l'aide (services de génétique moléculaire ou cytogénétique) pour rechercher des anomalies chromosomiques ou des mutations de gènes. Pour certains cancers, on ne peut poser le diagnostic que si on a la translocation spécifique qui va avec. Dans ce cas, on fait des coupes en paraffine de la zone tumorale d'intérêt qu'on envoie en cytogénétique ou en génétique moléculaire, et ils font leur analyse chromosomique ou d'extraction d'ADN pour rechercher des mutations.

Après, les anapath donnent les facteurs pronostics au clinicien. Typiquement, dans les maladies inflammatoires, si il y a beaucoup d'activité, si l'inflammation est aigue à PNE ou PNN, si elle est chronique, s'il y a de la fibrose ou non. Dans les tumeurs on donne la taille, s'il y a des embolies, le stade PTNM (= extension loco-régionale de la tumeur).

Autres techniques complémentaires : (non réalisées par anapath)

- **Biologie moléculaire** : LMNH, amplification de l'oncogène (N-Myc dans les neuroblastomes, BC1, dans les LMNH du manteau...)
- **Cytogénétique** : caryotype des cellules tumorales (Cr7 dans les RCC-TP)
- **FISH/CISH** : sondes d'ADN

Facteurs pronostiques

- facteurs histologiques
- stade TNM
 - T : extension locorégionale de la tumeur (T1 à T4)
 - N : métastase ganglionnaire régionale
 - M : métastase à distance

X : impossibilité d'évaluation

R : qualité de la résection après chirurgie (rectum)

Facteurs de réponse thérapeutique

Globalement, la prof veut qu'on connaisse:

- ce qu'il se passe quand un prélèvement arrive dans un service d'anapath (de la réception au rendu des lames)
- ce que c'est qu'un examen extemporané
- ce que c'est que la macroscopie
- le fixateur qu'on utilise = formol
- la coloration standard qu'on utilise = HES
- la technique complémentaire qui permet de rechercher l'expression de protéines par un tissu = l'immunohistochimie ou immunofluorescence
- les prélèvements à faire en macroscopie, au minimum= quand on a une tumeur, on prend les limites chirurgicales, les ganglions, les prélèvements sur la tumeur, les prélèvements sur d'autres lésions

NB: On fait aussi des prélèvements de tissu sain pour comparer. Souvent on les a au niveau des limites, mais si on ne l'a pas on fait un prélèvement non tumoral (par exemple pour le colon on fait toujours un prélèvement de tissu sain pour avoir un tissu de référence).

RECAP

1. réception, enregistrement
2. congélation puis fixation formol
3. examen extemporané
4. macroscopie : protocoles/fiches standardisées..
5. histologie
6. colorations spéciales / IHC / IF
7. techniques complémentaires: ME, biologie moléculaire, FISH, CISH

VIII-Quizz

1-Le pathologiste intervient dans:

- A. le diagnostic d'un cancer
- B. la recherche d'une mutation d'un gène par séquençage nouvelle génération (NGS)
- C. la détermination de facteurs histopronostiques d'une tumeur
- D. le choix d'éventuelles thérapies grâce à la recherche de l'expression de biomarqueurs
- E. l'annonce du diagnostic au patient

2-Le pathologiste peut être amené à travailler sur:

- A. du tissu frais
- B. du tissu fixé en formol
- C. des pièces opératoires
- D. des cellules
- E. de l'ADN
- F. sur un liquide

3-Dans sa démarche diagnostique, le pathologiste peut s'aider des techniques suivantes:

- A. colorations spéciales
- B. immunohistochimie
- C. immunofluorescence
- D. CGH array
- E. caryotype

4-L'examen extemporané:

- A. permet d'obtenir un résultat/diagnostique rapide (dans les 30 mn)
- B. est demandé par le chirurgien pour l'orienter vers une décision chirurgicale thérapeutique
- C. se fait sur tissu fixé en paraffine
- D. se fait sur tissu frais congelé
- E. peut se faire sur un prélèvement liquidien
- F. peut être demandé par le chirurgien pour une analyse du caryotype d'une tumeur

5-Parmi ces possibilités, quelle est celle qui répond correctement aux étapes de la prise en charge d'un prélèvement tissulaire ?++

- A. enregistrement, macroscopie, fixation, coupe, inclusion, lecture histologique
- B. Macroscopie, enregistrement, coupe, fixation, inclusion, coloration, lecture histologique
- C. Enregistrement, fixation, macroscopie, inclusion, coupe, coloration, lecture histologique
- D. Enregistrement, fixation, macroscopie, coupe, inclusion, coloration, lecture histologique

6-Parmi ces colorations quelle est celle qui est la plus utilisée pour la lecture histologique des coupes tissulaires ?

- A. PAS
- B. Bleu Alcian
- C. Grocott
- D. Rouge Congo
- E. HES
- F. Rouge Sirius

7-La tumorothèque à visée sanitaire (INCa) intéresse les tumeurs suivantes

- A. rhabdomyosarcome
- B. néphroblastome de l'enfant
- C. adénocarcinome colique
- D. mélanome malin
- E. lymphome B à grandes cellules
- F. angiosarcome d'un patient HIV+

8-Quelle est la coloration standard utilisée en anapath ?

9-Quelle coloration est utilisée pour mettre en évidence des spores ?

10-Quelle coloration est utilisée pour mettre en évidence des dépôts amyloïdes ?

11-Quelle étape fait suite à la fixation dans le formol ?

12-Quelle est la technique qui utilise des Ac qui permettent de cibler des protéines sur une coupe incluse en paraffine ?

13- Quelle technique utilise le même principe mais est réalisée sur des coupes congelées ?

14- Quelles sont les 3 tumeurs où l'on doit congeler systématiquement les prélèvements ?++

Que recherche t-on lorsqu'on utilise une coloration

15- PAS ?

16-grocott ?

17-Rouge congo ?

Réponses :

1- ACD 2-ABCDF 3-ABC 4-ABD 5-C

6-E. PAS et **Bleu Acyan** permettent tous les deux de mettre en évidence la présence de mucines, avec des mucines de pH différents. Si on est en présence d'une tumeur peu différenciée, qu'on fait une coloration PAS et Bleu Acyan qui est positive, cela veut dire que la tumeur sécrète du mucus et donc cela provient obligatoirement de glandes (on peut par exemple orienter vers les glandes salivaires, le colon, etc...). Le PAS, en plus permet, comme le Grocott, de mettre en évidence des champignons. Le rouge congo est utilisé pour l'amylose, et le rouge sirius permet de colorier le collagène, dès qu'on a de la fibrose. Pour les organes transplantés par ex, dès qu'on veut voir le pourcentage de fibrose, on fait un rouge sirius.

7-ABEF Donc on doit vérifier enfant/ sarcome/lymphome quel que soit le sous-type.

8- C'est HES 9- C'est la coloration PAS 10- C'est le Rouge Congo 11-C'est la macroscopie 12-C'est l'immunohistochimie. 13-C'est l'immunofluorescence 14- Ce sont les sarcomes, lymphomes et les tumeurs pédiatriques 15- Avec PAS on recherche des champignons par exemple des candidoses 16- Avec le Grocott on recherche aussi des champignons 17-Avec le Rouge Congo on recherche des amyloses