

Item 290 – Le médecin préleveur de cellules et/ou tissus pour des examens d’anatomie et de cytologie pathologiques

Collège Français des Pathologistes (CoPath)

2013

Table des matières

1. Généralités.....	3
1.1. Prélèvements.....	3
1.2. Modalités de transmission et d'envoi des prélèvements en anatomie et cytologie pathologiques.....	4
1.3. Techniques de base en anatomie et cytologie pathologiques.....	4
1.4. Interprétation des images, comptes-rendus d'anatomie et cytologie pathologiques.....	5
1.5. Archives, recherche.....	6
1.6. Double lecture.....	6
2. Examen extemporané.....	6
2.1. Définition.....	6
2.2. Applications.....	6
2.3. Techniques.....	7
2.4. Limites.....	7
3. Biologie moléculaire non morphologique.....	7

Objectifs ENC

- Connaître les modalités de transmission de ces prélèvements au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques.
- Connaître les principes de base de réalisation des techniques morphologiques suivantes : cytologie, histologie, immunohistochimie, hybridation in situ.
- Connaître les principes permettant de réaliser des techniques de biologie moléculaire non morphologiques sur les prélèvements tissulaires/cellulaires, ainsi que leurs principales indications.
- Connaître les principales indications de l'examen extemporané, son principe de réalisation et ses limites.
- Connaître les exigences nécessaires pour l'utilisation des prélèvements dans des travaux de recherche.

Connaître les principes de réalisation, transmission et utilisation des prélèvements à visée sanitaire et de recherche

1. Généralités

1.1. Prélèvements

Différents prélèvements peuvent faire l'objet d'une analyse anatomocytopathologique :

- liquides, frottis ;
- produits de ponctions à l'aiguille ;
- biopsies ;
- pièces opératoires...

On distingue les prélèvements ramenant :

- uniquement des cellules (examen **cytologique**) ;
- des cellules et du tissu de soutien (examen **histologique**).

Ces prélèvements sont faits par des médecins, en suivant les recommandations de bonne pratique et en respectant les contre-indications.

L'obtention de tissu se faisant toujours par des techniques plus ou moins invasives, les prélèvements sont précieux, et il faut savoir quel sera l'apport de l'analyse anatomopathologique pour la prise en charge du patient ainsi que la valeur du résultat donné.

Quasiment tout tissu prélevé va faire l'objet d'un examen anatomopathologique, parfois à titre systématique (exemple : une chirurgie pour rupture splénique après accident de la voie publique peut faire découvrir une pathologie splénique sous-jacente méconnue jusque-là).

Cellules et tissus peuvent aussi faire l'objet d'autres analyses souvent effectuées dans d'autres laboratoires (lavage bronchoalvéolaire avec envoi aussi en parasito-mycologie, ou fragment de biopsie ganglionnaire pour analyse en biologie moléculaire ou cytométrie en flux).

Lorsqu'un prélèvement cellulaire et/ou tissulaire est effectué/prescrit, il faut toujours **préciser quel type d'analyse est souhaité sur le prélèvement** (exemple : biopsie avec examen anatomopathologique, lavage bronchoalvéolaire avec analyse anatomopathologique + bactérioparasito et mycologique) et adresser le prélèvement au laboratoire adéquat.

1.2. Modalités de transmission et d'envoi des prélèvements en anatomie et cytologie pathologiques

L'obtention de tissu se faisant toujours par des techniques plus ou moins invasives, les prélèvements sont précieux.

Une transmission des prélèvements faite de manière incorrecte peut avoir des conséquences graves sur le résultat de l'analyse et donc pour le patient.

Les prélèvements sont adressés avec :

- l'identification du patient sur le contenant ;
- et une feuille de demande.

Sur la feuille de demande d'examen anatomopathologique doivent figurer :

- les identifiants du patient ;
- l'adresse du patient et/ou du service de consultation ou d'hospitalisation ;
- le nom du médecin préleveur et ses coordonnées ;
- le caractère urgent éventuel de la demande ;
- la nature du prélèvement ;
- le siège du ou des échantillons ;
- la date et l'heure du prélèvement ;
- les renseignements cliniques pertinents ;
- les recherches particulières demandées.

Le prélèvement sera en général adressé fixé pour empêcher l'autolyse du tissu (le plus souvent par immersion dans du formol dilué (% v/v)).

En l'absence de fixation, il faut adresser le prélèvement le plus rapidement possible au laboratoire pour éviter l'autolyse et/ou la dessiccation du prélèvement.

Il existe des cas où le prélèvement ne doit pas être adressé fixé. Ces cas sont les suivants :

- demande d'examen extemporané (*cf. infra*) ;
- demande de recherche de graisses dans le tissu (l'inclusion en paraffine dissout les graisses) ;
- demande d'un examen en immunofluorescence directe (biopsie cutanée, rénale, typage d'amylose par exemple) ;
- tumeur pédiatrique, suspicion de lymphome, sarcome (congélation de tissu tumoral frais à but sanitaire recommandée avant la fixation – recommandations INCa 2011).

1.3. Techniques de base en anatomie et cytologie pathologiques

1. Pour la cytologie

- Fixation/mise sur support (lame).
- Coloration.

Mise sur support : les cellules peuvent être directement étalées sur lames, soit par cyto centrifugation soit par étalement (frottis).

L'étalement en monocouche consiste à recueillir les cellules dans un liquide de préservation. Au laboratoire, les cellules sont remises en suspension, concentrées et transférées sur lame en une couche.

La fixation des cellules peut se faire par dessiccation rapide (à l'air), ou par immersion dans un alcool, ou par pulvérisation d'une laque de type laque pour cheveux secondairement hydrosoluble.

Les lames sont ensuite colorées et examinées.

La technique est rapide.

Les examens cytologiques ne donnent en général qu'une orientation diagnostique ++.

2. Pour l'histologie

- Fixation.
- Éventuellement dissection avec choix des prélèvements pour les pièces volumineuses (cela rajoute un jour de délai à la technique).
- Imprégnation et inclusion en paraffine, obtention du bloc de paraffine.
- Coupe du bloc et mise sur lame de la coupe.
- Déparaffinage et coloration de la coupe.

Cette technique prend habituellement une journée (rajouter un jour supplémentaire en cas de dissection). Les progrès techniques tendent à diminuer ces délais et permettent pour certains examens urgents de disposer du résultat le jour même du prélèvement.

Il y a parfois nécessité d'avoir le résultat anatomopathologique très rapidement (en quelques minutes) pour une décision quasi immédiate. Un examen extemporané pourra alors être demandé en connaissant bien ses limites (*cf. infra*).

3. Immunohistochimie, immunocytochimie

Ces techniques permettent d'identifier et de localiser des protéines sur une préparation histologique ou cytologique grâce à ses propriétés antigéniques.

Elles s'effectuent sur des lames non colorées (lames « blanches ») après déparaffinage éventuel.

Si l'antigène recherché est présent dans le prélèvement, il fixera l'anticorps marqué, et le point précis où se trouve le complexe antigène-anticorps apparaîtra au microscope, soit sous forme d'une zone fluorescente si l'anticorps est lié à un fluorochrome, soit sous forme d'une zone colorée si l'anticorps est couplé à une enzyme révélée par une méthode histoenzymatique.

Dans les méthodes immunoenzymatiques indirectes : l'anticorps spécifique primaire est déposé sur le tissu, puis il est révélé par un deuxième anticorps couplé à une enzyme à laquelle on fournit son substrat. Le produit coloré de la réaction enzymatique apparaît au niveau du site des complexes antigène-anticorps (Ag-Ac).

4. Hybridation in situ

Le principe de cette technique est d'identifier une séquence d'acide nucléique, ARN ou ADN, présent dans des cellules d'une préparation histologique ou cytologique.

Les sondes nucléiques sont couplées à des traceurs, fluorochrome (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) ou enzyme (*chromogenic in situ hybridization*, CISH). La visualisation au microscope de l'acide nucléique recherché, auquel s'est fixée la sonde, utilise donc des méthodes identiques à celles utilisées pour l'immunohistochimie.

1.4. Interprétation des images, comptes-rendus d'anatomie et cytologie pathologiques

Les lames sont examinées au microscope par un médecin anatomopathologiste et d'autres techniques éventuellement réalisées (colorations spéciales, immunohistochimie, biologie moléculaire...).

L'analyse anatomocytopathologique se base sur l'interprétation d'images, souvent en fonction du contexte clinique. Le résultat est exprimé et diffusé sous forme de compte-rendu écrit.

La terminologie utilisée dans les comptes-rendus d'anatomie pathologique est une terminologie médicale dont il faut connaître la signification exacte (cf. annexe du chapitre 2 « Terminologie utilisée dans les CR de pathologie tumorale »).

Pour les principales pathologies tumorales, l'INCa (Institut national du cancer) et la Société française de pathologie ont défini les informations essentielles à la prise en charge des malades, et devant figurer sur un compte-rendu. Ces informations sont appelées « données minimales » et sont définies dans un référentiel mis à jour régulièrement (<http://www.e-cancer.fr/soins/lanatomopathologie>).

1.5. Archives, recherche

Les lames et les blocs des tissus inclus en paraffine sont conservés au laboratoire suivant la réglementation.

Sur le bloc conservé, il est possible de faire secondairement (jusqu'à plusieurs années après) :

- des études complémentaires à but sanitaire (mise en évidence de protéines par immunohistochimie, analyse de biologie moléculaire après extraction de l'ADN du tissu, etc., pour prescrire un médicament par exemple) ;
- des travaux de recherche (en suivant les règles en vigueur concernant l'information/consentement du patient, la confidentialité des données et la traçabilité).

Les travaux de recherche peuvent également être faits sur les prélèvements congelés conservés.

1.6. Double lecture

Certaines pathologies sont de diagnostic difficile (tumeurs rares, images d'interprétation équivoque, nécessité d'adjoindre des techniques spécialisées d'immunohistochimie ou biologie moléculaire...).

Le pathologiste responsable de l'examen peut donc être amené à prendre l'avis d'un deuxième pathologiste.

Pour les lymphomes, sarcomes, mésothéliomes et les tumeurs neuroendocrines rares, l'INCa a mis en place une double lecture systématisée par des réseaux de référence anatomopathologiques.

2. Examen extemporané

2.1. Définition

Il s'agit d'un examen anatomopathologique réalisé le plus souvent en cours d'intervention chirurgicale dans le but de fournir un résultat en général en moins de 30 minutes.

L'examen extemporané ne doit être demandé que si la réponse a une incidence sur la conduite de l'acte en cours ++.

2.2. Applications

Les **applications** les plus fréquentes ont pour but de :

- déterminer la nature tumorale ou non d'une lésion ;
- déterminer la nature bénigne ou maligne d'une tumeur ;
- évaluer des limites de résection en cas de pathologie tumorale ;
- évaluer l'atteinte du ganglion sentinelle (cancer du sein) ;
- s'assurer qu'un prélèvement a bien intéressé un territoire lésionnel représentatif de la maladie et a ramené suffisamment de matériel.

2.3. Techniques

Le prélèvement doit être adressé immédiatement, à l'état frais, sans fixateur ni sérum physiologique.

Le plus souvent, l'examen extemporané est histologique ; il est effectué sur un tissu frais durci par congélation (-20 °C environ) et coupé avec un *microtome à congélation* (microtome dans une enceinte réfrigérée) et coloration rapide de la coupe. Cette technique permet un résultat en général en moins de 30 minutes.

N.B. : plus rarement, on peut faire un examen extemporané par méthode cytologique (cytoponctions, liquides, appositions...).

2.4. Limites

L'avis extemporané ne représente pas une réponse définitive. Les coupes obtenues n'ont pas la qualité d'une coupe après inclusion en paraffine (figures 1 et 2).

Figure 1 : Lame d'extemporané de recoupe pancréatique (coupe au cryostat)

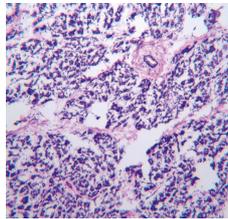
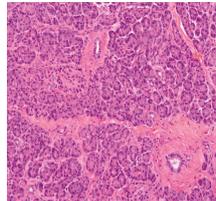


Figure 2 : Contrôle de l'examen extemporané après inclusion en paraffine permettant une analyse morphologique plus précise



Les résultats sont moins précis et moins fiables que ceux d'un examen anatomocytopathologique conventionnel, et doivent toujours être vérifiés par inclusion en paraffine du tissu restant.

La congélation à -20 °C abîme le tissu. Si le prélèvement soumis à examen extemporané est exigu et unique, la congélation peut l'altérer irrémédiablement et interdire un diagnostic plus précis ultérieur, après reprise en paraffine.

Les prélèvements calcifiés ne peuvent pas faire l'objet d'un examen extemporané par coupe au cryostat (impossibilité de réaliser les coupes).

L'examen extemporané allonge les délais opératoires.

3. Biologie moléculaire non morphologique

Les prélèvements cellulaires et tissulaires peuvent être utilisés pour des analyses de biologie moléculaire non morphologiques (recherche de clonalité, de perte d'hétérozygotie, de mutations, de réarrangements, etc.).

Ces analyses sont parfois cruciales pour le diagnostic de certaines pathologies tumorales (lymphomes, sarcomes...), l'établissement d'un pronostic (ex : recherche d'amplification de N-Myc dans les neuroblastomes) ou pour la thérapeutique (ex : recherche de mutations d'EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires permettant la prescription de molécules à activité d'anti-EGFR).

Les principales indications de ces techniques sont développées dans les chapitres correspondants aux pathologies.

Les techniques de biologie moléculaire non morphologiques sont au mieux réalisées sur des prélèvements congelés, d'où la recommandation de l'INCa de congeler des fragments tissulaires tumoraux, non fixés, en cas de tumeur pédiatrique, suspicion de lymphome, ou sarcome.

Les analyses de biologie moléculaire non morphologiques peuvent aussi être effectuées sur des prélèvements fixés au formol tamponné. Cependant, l'ADN extrait à partir de tissu fixé et inclus en paraffine est fragmenté. Son amplification par *polymerase chain reaction* (PCR) peut de ce fait s'avérer plus difficile.

Toutes ces analyses (sur cellules isolées, tissu frais, congelé ou fixé) doivent impérativement être effectuées après un **contrôle morphologique du prélèvement analysé** pour s'assurer de la nature effectivement tumorale du prélèvement et de sa qualité (pourcentage de cellules tumorales présentes, nécrose).

Points essentiels

- Quasiment tout tissu prélevé va faire l'objet d'un examen anatomopathologique, parfois uniquement à titre systématique. Mais les cellules et tissus peuvent aussi faire l'objet d'autres analyses.
- Lorsqu'un prélèvement cellulaire et/ou tissulaire est effectué/préscrit, il faut toujours préciser quel type d'analyse est souhaité sur le prélèvement et adresser le prélèvement au laboratoire adéquat.
- La technique histologique prend habituellement une journée (rajouter un jour en cas de dissection).
- L'analyse anatomocytopathologique se base sur l'interprétation d'images, souvent en fonction du contexte clinique.
- Pour les principales pathologies tumorales, l'INCa et la Société française de pathologie ont défini les informations essentielles à la prise en charge des malades et devant figurer sur un compte-rendu (données minimales).
- Pour les lymphomes, sarcomes, mésothéliomes et les tumeurs neuroendocrines rares, l'INCa a mis en place une double lecture systématisée par des réseaux de référence anatomopathologiques.
- Sur le bloc tissulaire conservé au laboratoire, il est possible de faire secondairement des études complémentaires à but sanitaire, et éventuellement des travaux de recherche (en suivant les règles en vigueur concernant l'information/consentement du patient, la confidentialité des données et la traçabilité).
- Il existe des cas où le prélèvement ne doit pas être adressé fixé au laboratoire :
 - demande d'examen extemporané ;
 - demande de recherche de graisses dans le tissu ;
 - demande d'un examen en immunofluorescence directe ;
 - tumeur pédiatrique, suspicion de lymphome, sarcome (congélation de tissu tumoral frais à but sanitaire recommandée avant la fixation – recommandations INCa 2011).
- Les analyses de biologie moléculaire non morphologiques peuvent être faites sur des cellules et tissus, et sont au mieux réalisées sur des prélèvements congelés. Ces analyses (sur cellules isolées, tissu frais, congelé ou fixé) doivent impérativement être effectuées après un contrôle morphologique du prélèvement.
- La définition, les applications, principes et limites de l'examen extemporané doivent être connus.