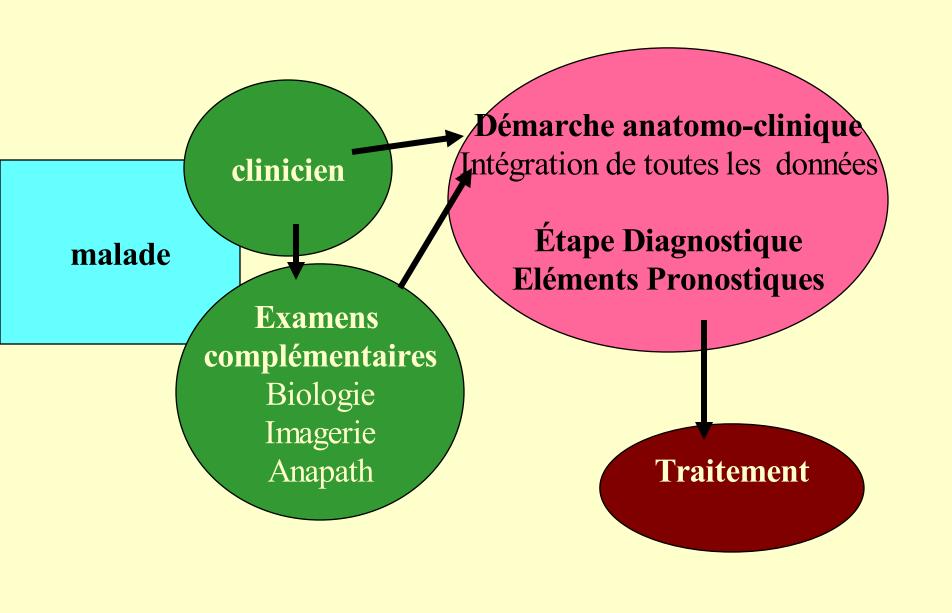
# Anatomie et Cytologie Pathologiques (ACP)

Buts, techniques, résultats

D Hénin

http://anapath-paris7.aphp.fr

Site de l'UMVF, polycopié national fait par l'AFECAP <a href="http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/umvf/anapath/corpus.htm">http://medidacte.timone.univ-mrs.fr/webcours/umvf/anapath/corpus.htm</a>



# ACP, élément de la démarche anatomo-clinique

Etude des lésions survenant au cours d'une maladie, prélevées puis examinées

A l'oeil nu : macroscopie

Avec un microscope

- ❖Photonique (« microscopie optique », G x 1000)
  - \*Sur des cellules isolées : cytologie
  - **☆ Sur des tissus : histologie**

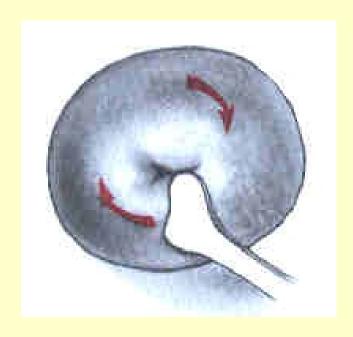
Biopsie, pièce opératoire, autopsie

**♦***Electronique : ultrastructure (Gx40000)* 

# Quelques exemples de prélèvements

Prélèvement pour analyse cytologique Biopsie Pièce opératoire Autopsie

## Femme de 54 ans Frottis cervico-utérin systématique

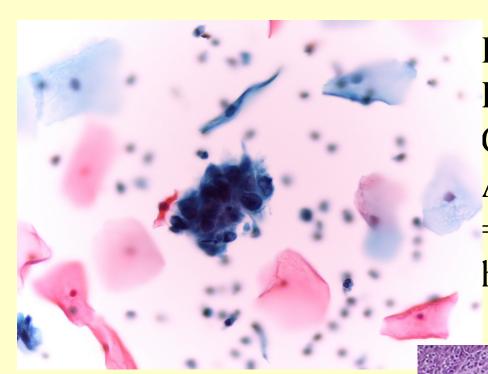


Étalement sur la lame Transmission en ACP Coloration

# 02 11101

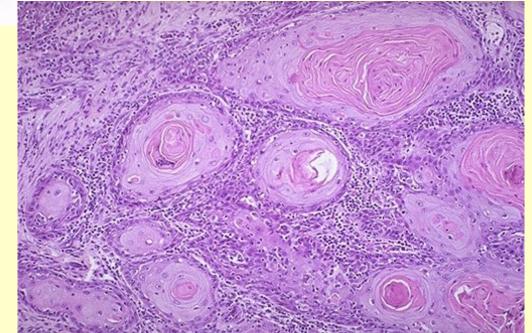
Frottis cervico-utérin



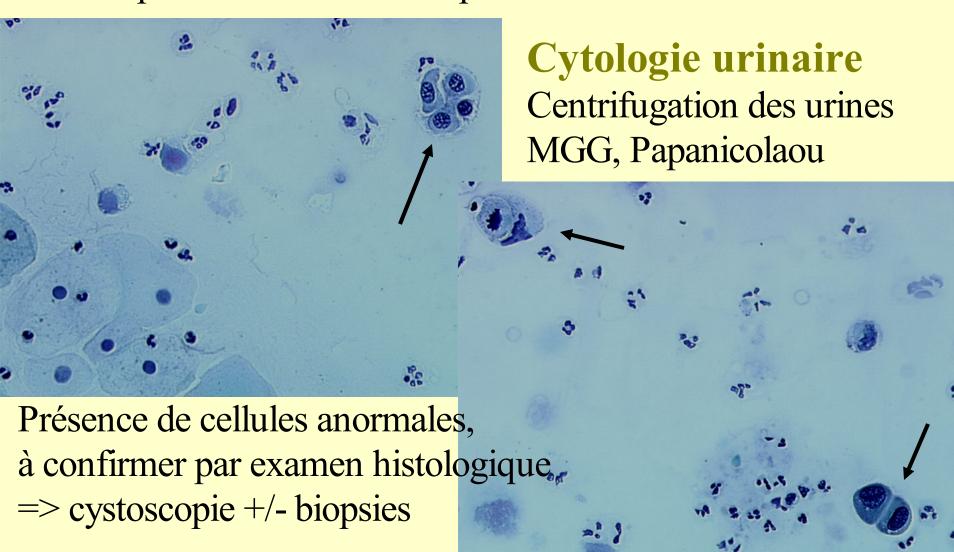


Frottis cervico-utérin
Examen cytologique
Coloration Papanicolaou
Amas de cellules anormales
=> Nécessite une confirmation
histologique sur biopsie

Colposcopie,
Biopsie du col utérin
Examen histologique
Carcinome épidermoïde
du col de l'utérus



Homme de 50 ans, fumant 40 paquets/année, travaillant dans l'industrie textile où il manipule des colorants, visite médicale. Il ne se plaint d'aucun trouble particulier.



# Cytologie

### Etude de cellules isolées, déposées sur une lame de verre Types de prélèvement

- > Liquides
  - ✓ Physiologiques (LCR, urines)
  - ✓ Epanchement des séreuses (pleurésie, ascite..)
  - ✓ Lavage broncho-alvéolaire
- Fattage: muqueuses (buccale, génitale...) FCU, cytodg herpès
- ➤ Brossage : muqueuse bronchique
- Appositions de biopsies, pièces opératoires avant fixation
- Ponction à l'aiguille, +/- contrôle écho, scanner...

  Masse ou organe plein /kyste: gg, nodule sein, thyroïde...

- •Femme de 36 ans. Déficit moteur proximal récent isolé.
- •Atteinte musculaire? nerveuse?
- •VS: 25-50; Enzymes musculaires élevées
- •EMG: potentiels déchiquetés, polyphasiques, de petite taille
- => atteinte musculaire
- •Polymyosite? Sarcoïdose? Autre diagnostic?

=> Biopsie musculaire chirurgicale





### Nécrose disséminée des fibres musculaires

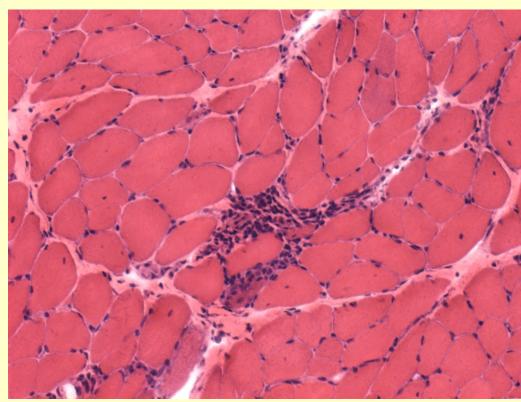
+ Infiltrat inflammatoire (lymphocytes macrophages)

=> Polymyosite

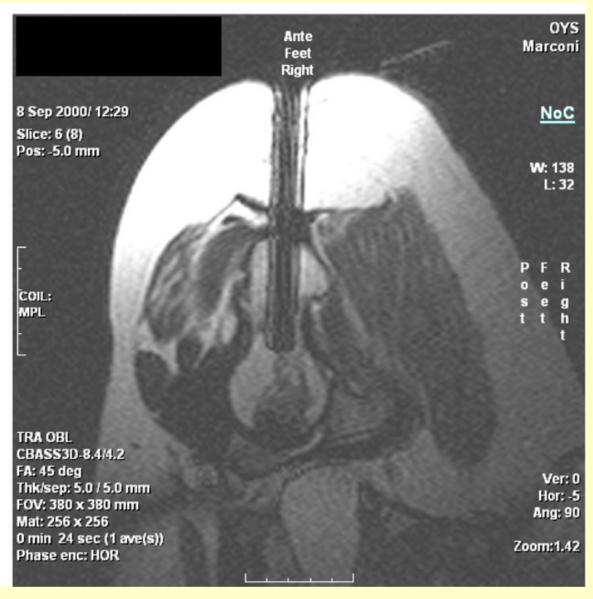
Traitement: corticothérapie

Pronostic: favorable





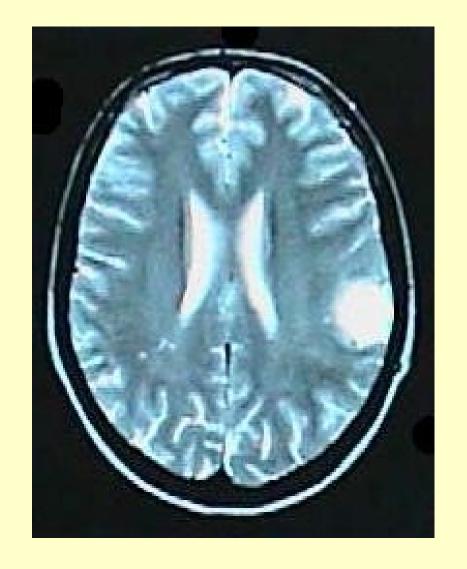
Même lésions inflammatoires mais présence de Vacuoles bordées => Myosite à inclusions Corticoïdes inefficaces



Homme de 72 ans
Douleur de la hanche
Lacune de la tête fémorale
Biopsie osseuse
guidée par IRM
sous anesthésie locale

Homme de 45 ans Crise convulsive généralisée IRM: lésion rolandique, nature?





=> Biopsie cérébrale guidée par stéréotaxie

# Biopsie

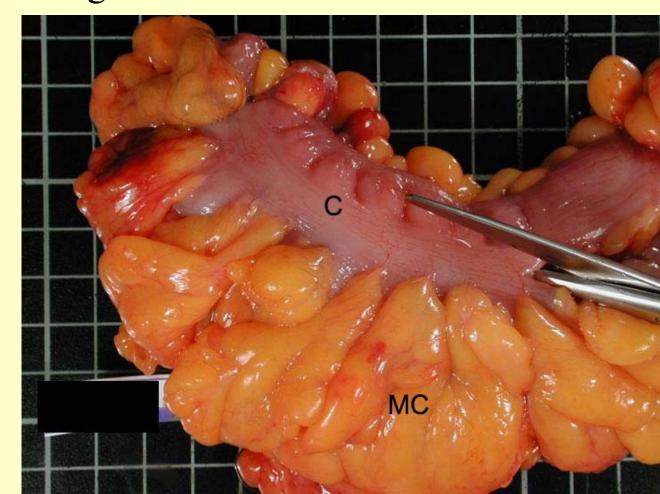
Prélèvement d'un fragment de tissu sur un être vivant

- "simple": partie de la lésion
- "exérèse": totalité de la lésion dans la biopsie
- « ponction biopsie » : trocart ou aiguille

### **Techniques**

- ✓ à l'aiguille (pfs sous écho, TDM): organes pleins (foie, rein, prostate...)
- ✓ au trocart : os, ostéo-médullaire
- ✓ à la pince (endoscopie): voies aériennes, tube digestif
- ✓ au bistouri : peau, muqueuses
- ✓ chirurgicale
- ✓ Stéréotaxique

Homme de 55 ans
Douleurs abdominales, Troubles du transit
Colonoscopie => Lésion sténosante, ulcérée
Biopsies => adénocarcinome
Résection colique chirurgicale



# Pièce opératoire

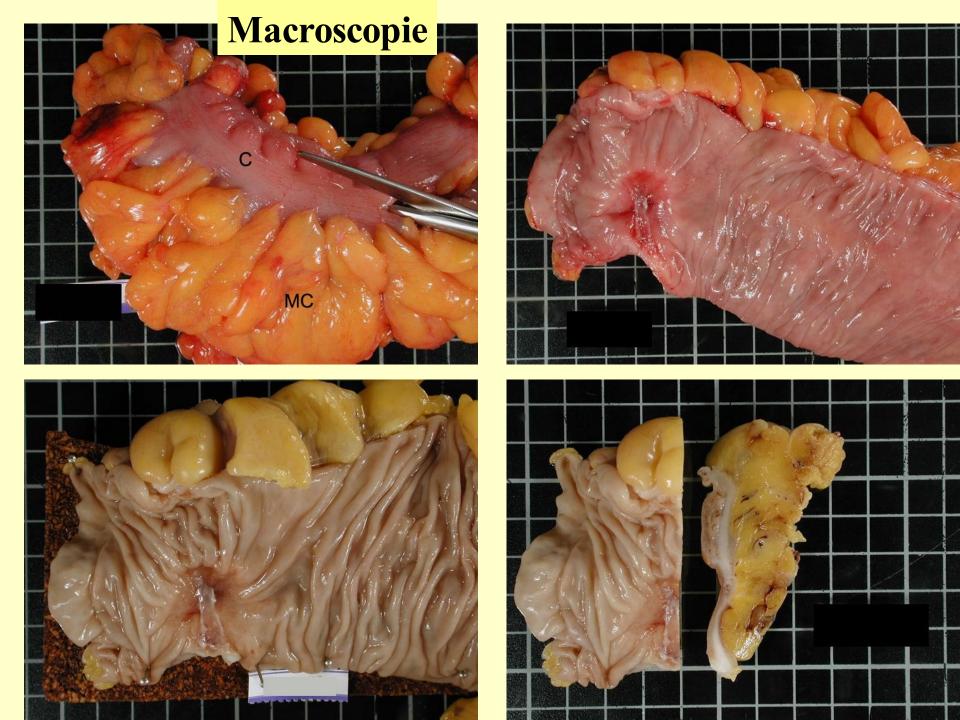
### Simple ou complexe

côlon, thyroïde, parotide...duodénopancréatectomie...

### Fraîche / fixée

### Examen macroscopique

- > Orientation anatomique et lésionnelle
- Mesures, Photos
- Prélèvements usuels: lésion, limites, ganglions ....
- Prélèvements particuliers si la pièce est fraîche congélation, cytologie, fixations diverses (gluta...)



### Fixation

- "Immobiliser et conserver les cellules et l'architecture tissulaire, de façon aussi proche que possible de leur aspect à l'état vivant"
- ✓ Mise en œuvre rapide
- ✓ Durée fn taille du Pt (qqs heures à quelques jours)
- ✓ Choix du fixateur en fonction
  - \* techniques complémentaires éventuelles
  - \* taille du prélèvement..
- ✓ En quantité suffisante pour la taille du fragment

### Fixateurs

### **Iypes**

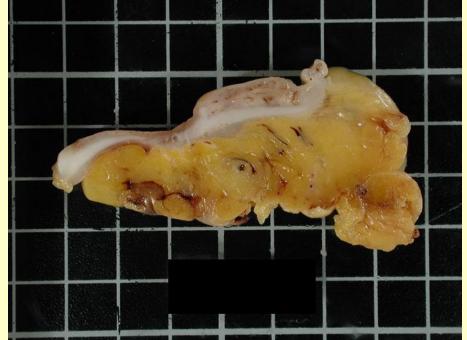
- ✓ Formol (tamponné, neutre, 10%), transparent
- ✓ Liquide de Bouin (acide picrique + formol), jaune
- ✓ AFA (alcool, formol, acide acétique)
- ✓ Glutaraldehyde (microscopie électronique)

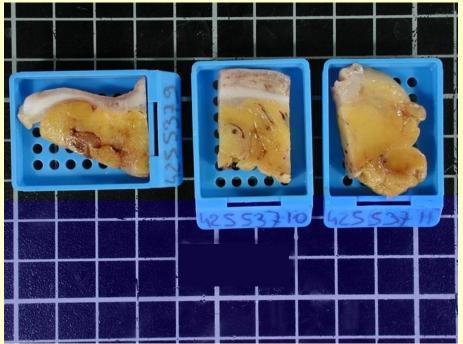
### Avantages /inconvénients

- · Diffusion F++
- · Consistance F conserve, B durcit
- · Qualité cytologique Bouin +++
- · Immunohisto F > B
- · Biologie moléculaire F+++

### $\Rightarrow$ Formol +++

- ⇒ Mais produit récemment classé cancérigène
- ⇒recherche de substituts (aussi efficaces, moins toxiques...)





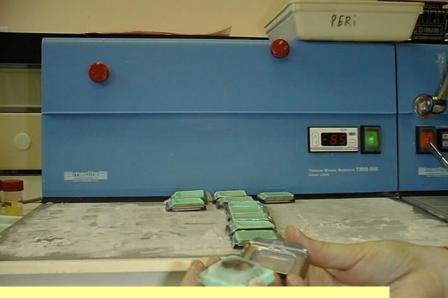
### Choix des prélèvements mise en cassettes



### Automate déshydratation (bains alcool) toluène (enlève les graisses) paraffine liquide chaude



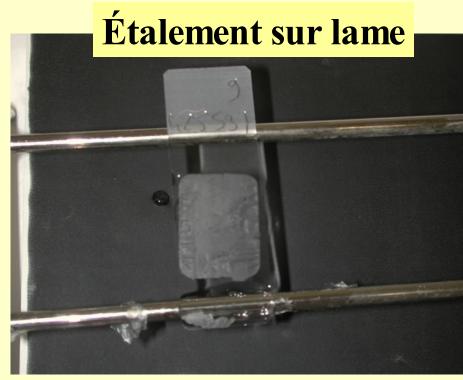


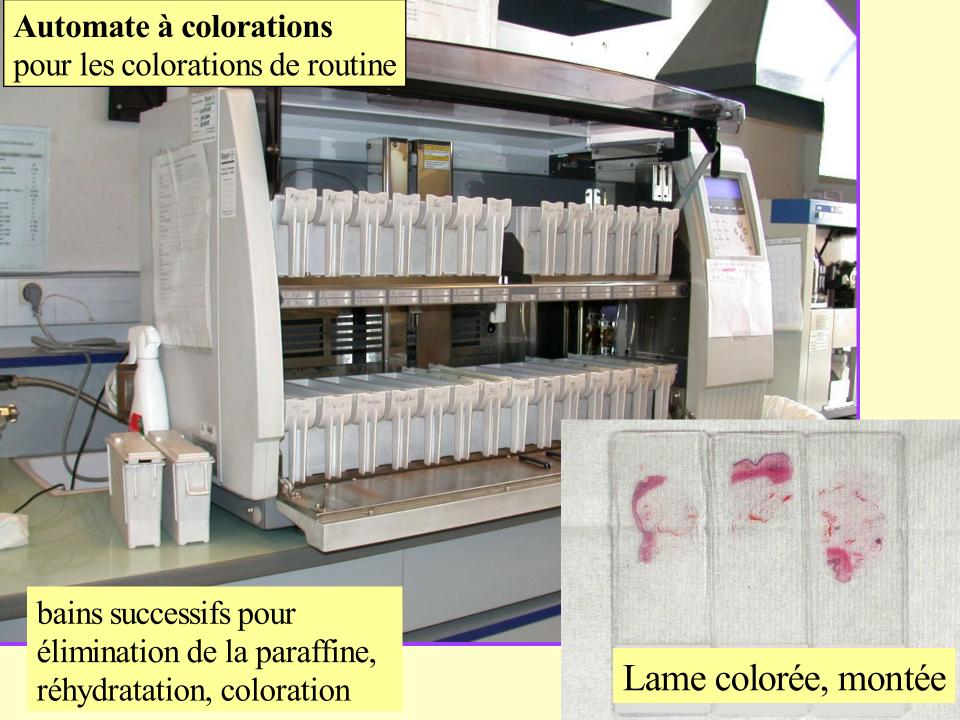


refroidissement : réalisation d'un bloc







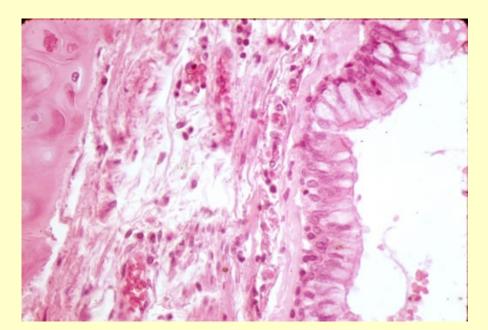


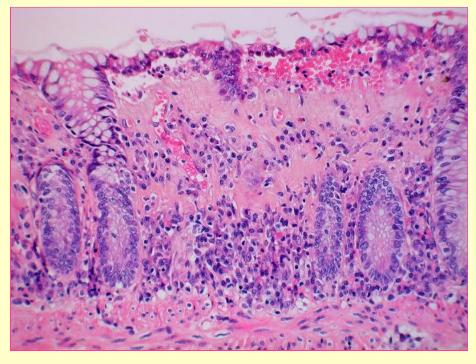
### Colorations de routine

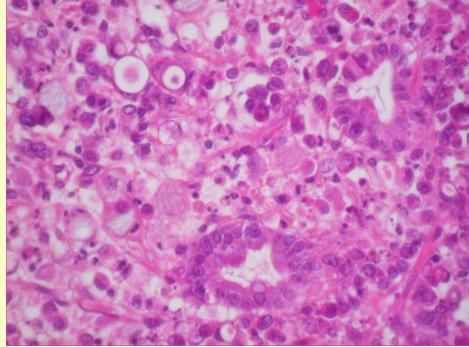
### HE

Hématéine : noyaux en bleu

Eosine: cytoplasme en rose







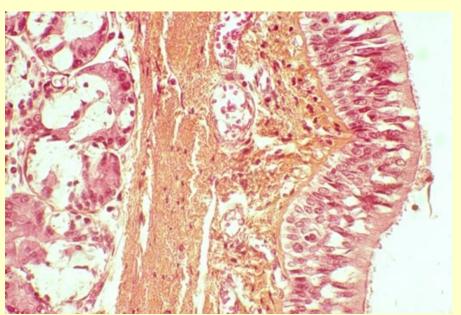
### Colorations de routine

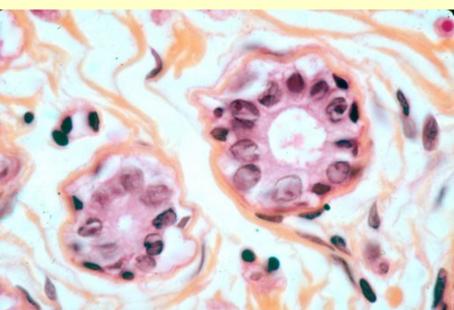
HES/HPS (coloration trichromique)

Hématéine / Hémalun : noyaux en bleu

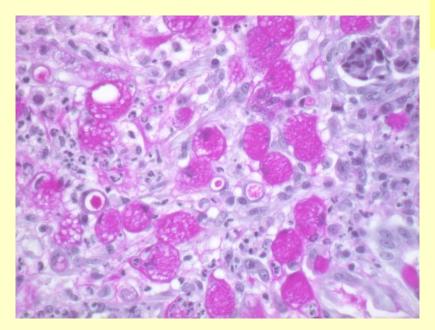
Eosine /Phloxine : cytoplasme en rose

Safran: tissu conjonctif en jaune

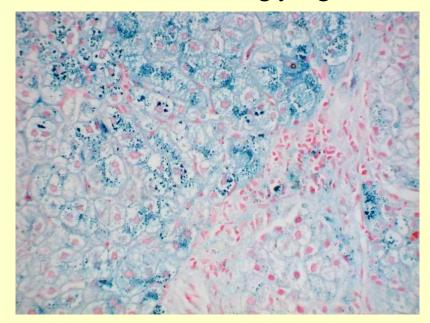




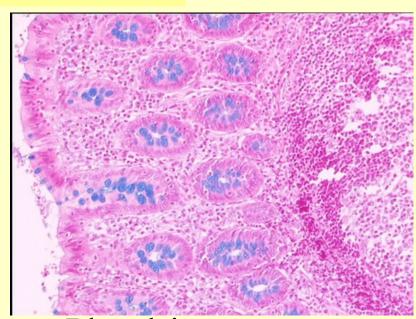
### **Autres colorations**



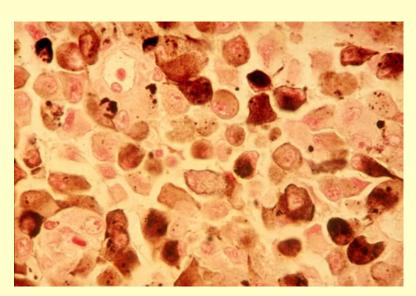
PAS: MPS neutres / glycogène en rouge



Perls: fer en bleu

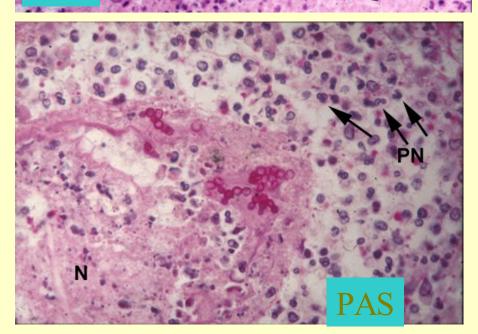


Bleu alcian: MPS en bleu



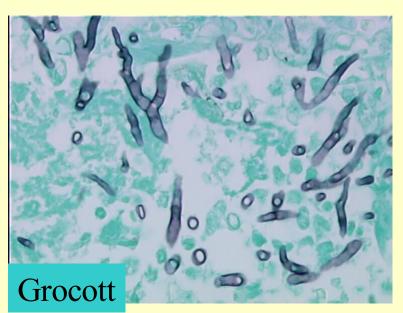
Fontana: mélanine en noir

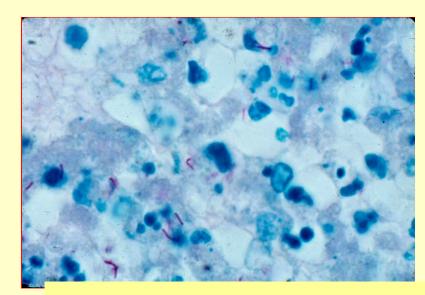
# FIN S



filaments mycéliens

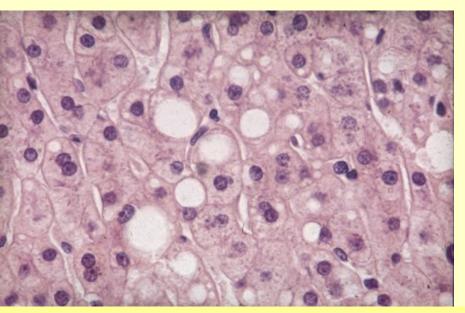
### Agents infectieux

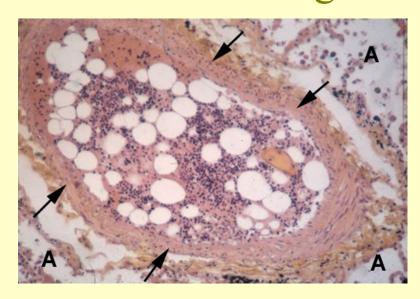




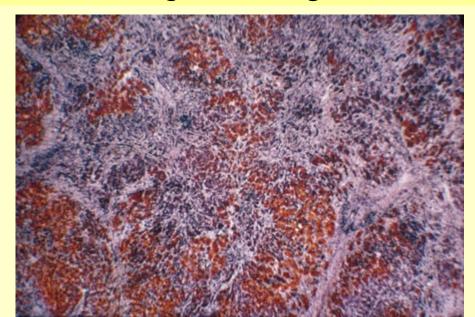
Ziehl pour les mycobactéries

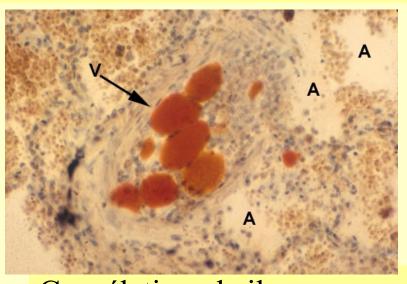
### Mise en évidence des graisses



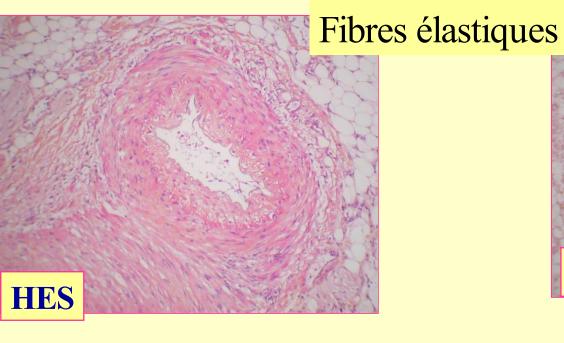


inclusion en paraffine : graisses dissoutes, vacuoles optiquement vides



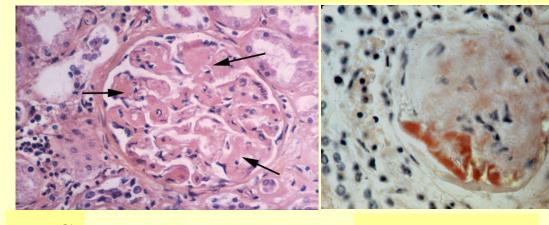


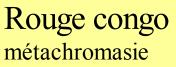
Congélation: huile rouge

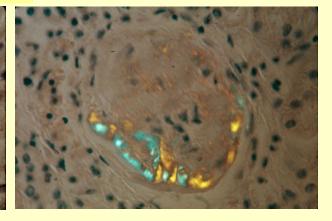




### Rein: caractérisation du dépôt amyloïde







Rouge congo Dichroïsme en lumière polarisée

**HPS** 

# Examen extemporané

Examen histologique rapide

Réalisé en cours d'intervention chirurgicale

Résultats peuvent modifier les suites de l'intervention

Technique

Le prélèvement : 1 à 2 cm max.

Sur pièce opératoire après analyse macro..., ou biopsie

Congélation, pour durcir et permettre la coupe, 4 µm

Coloration rapide: bleu toluidine, HE

Réponse immédiate (en 10 à 15 mn environ)





prélèvement congélation coupe au cryostat



# Examen extemporané

### Indications

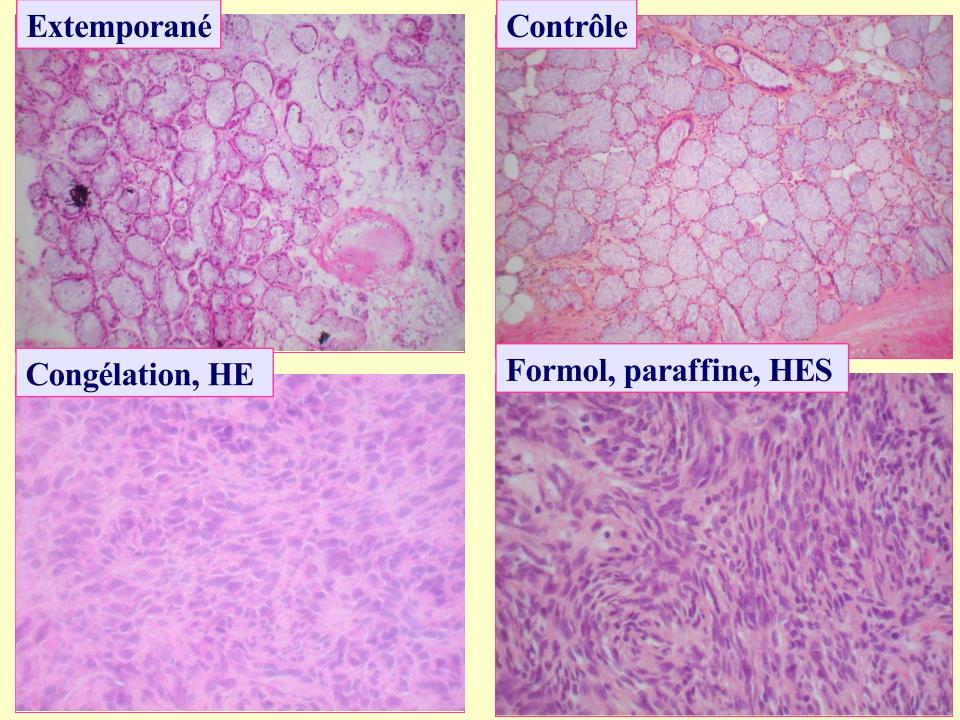
- ✓ Limites d'exérèse d'une tumeur
- ✓ Diagnostic de la nature d'une lésion : tumorale (bénin ou malin), ou non (inflammatoire...)
- ✓ Identification d'un prélèvement : ganglion, parathyroïde

### Résultat rapide

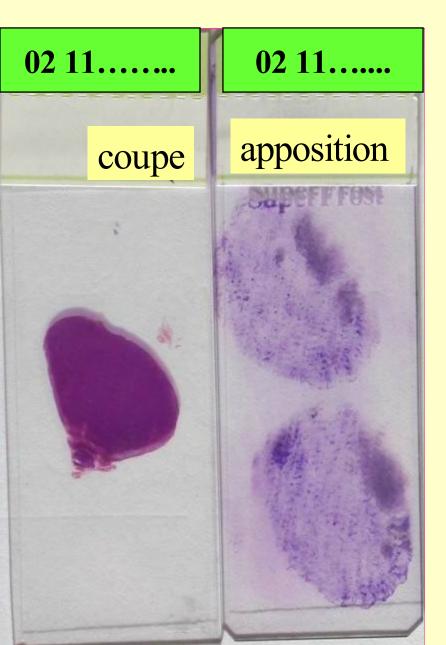
### Inconvénients

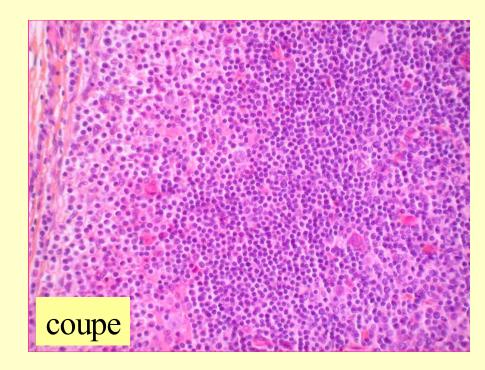
- ✓ petit fragment
- ✓ qualité technique +/-

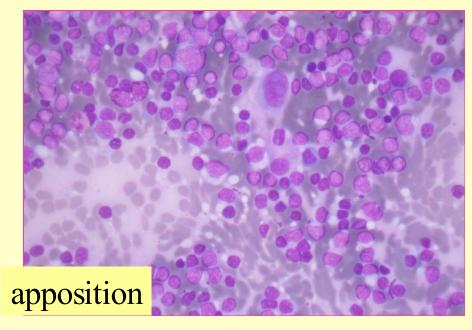
Contrôle histologique, après inclusion en paraffine



# Cytologie / histologie







# Cytologie

### **Indications**

- Répétitif, peu traumatisant, rapide
- Accès non chirurgical à une lésion profonde, nature?
- Dépistage (frottis gynéco), surveillance
- Complément d'examen histologique (hématologie)

### Limites

- Qualité technique étalement, fixation ...
- Morphologie des cellules d'interprétation parfois difficile normale / modif dues aux tt
- Histologie de "contrôle" toujours si suspicion de malignité

# Cytologie

### Techniques

- > Frottis
  - ✓ étalement d'emblée ou à partir du culot de centrifugation d'un liquide ou de la brosse...
  - ✓ doit être fait rapidement +++après le prélèvement
- > Appositions ou empreintes
- Séchage à l'air ou fixation par une laque
- Colorations: MGG, Papanicolaou...
- > Immunocytochimie



### Lames de cytologie







# Immunohisto/cyto-chimie

Mise en évidence sur une coupe histologique /cytologique de constituants tissulaires ou cellulaires ayant les propriétés d'un Ag, par un Ac spécifique

### Technique

- Coupe : après inclusion en paraffine /congélation
- Appliquer un anticorps poly- clonal (par immunisation d'un animal) mono- clonal (technique des hybridomes : fusion de plasmo tumoraux et cellules sensibilisées à un Ag)
- > Amplifier la réponse
  - Prétraitement pur démasquer l'Ag (chaleur, pH, protéase...)
  - complexe avidine-biotine
- ➤ Marquer l'Ac par un traceur (enzyme, fluorochrome ...)
- Révéler le traceur

# Immunohisto/cyto-chimie

### **Indications**

- ✓ Préciser la nature d'une tumeur : épithéliale, conjonctive, lymphoïde...
- ✓ Mettre en évidence une sécrétion, un agent infectieux...
- ✓ Participer à établir un pronostic, prévoir une réponse au traitement

## Exemples d'Anticorps

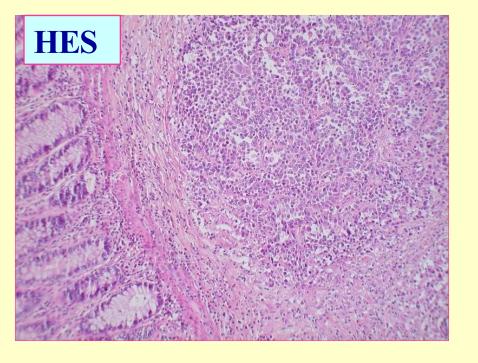
cellule épithéliale: anticytokératines KL1, CK7, CK20...

cellule lymphoïde: LC: CD45, B: CD20, T: CD 3...

cellule conjonctive: vimentine...

sécrétions : Ig  $\kappa/\lambda$ , sérotonine....

marqueur de prolifération : Ki67



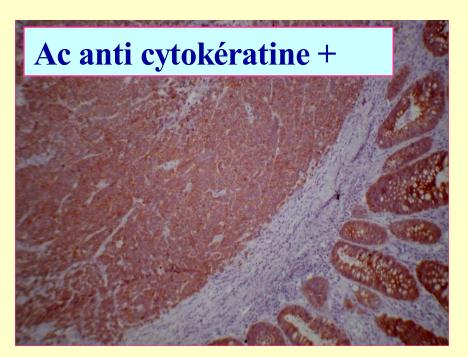


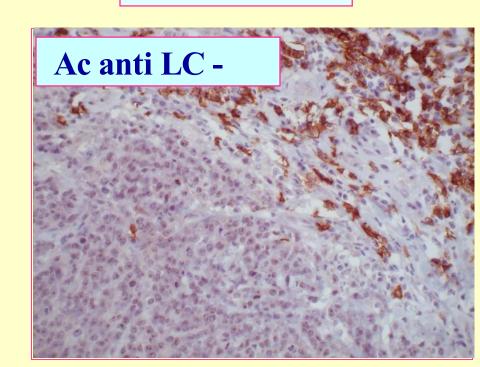
Ac anti-cytokératine (+)

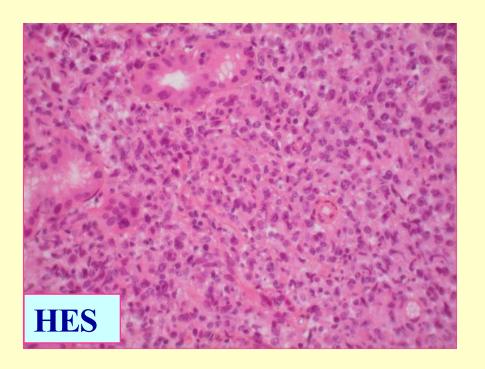
+

Ac anti LC (-)

= Carcinome







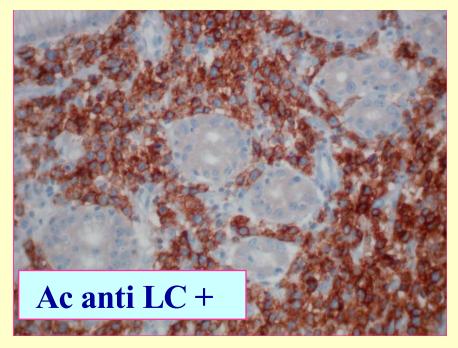


Ac anti LC (+)

+

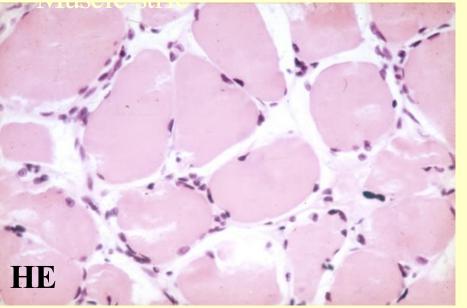
Ac anti-cytokératine (-)

= Lymphome

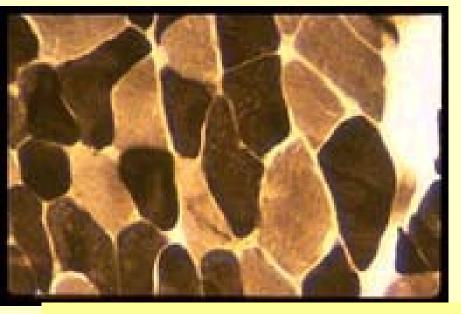




Histoenzymologie







Activité phosphatasique de la bordure en brosse des entérocytes

Typage des fibres musculaires ATPases 9,4

# Le compte rendu

Aboutissement de tout examen anatomo-pathologique histologique ou cytologique, fait partie du « dossier patient »

- Identité patient, médecin préleveur, médecin traitant
- Renseignements cliniques et autres communiqués par le préleveur
- Description des prélèvements reçus (macro, histo)
- > Résultat des techniques complémentaires pratiquées
- Diagnostic certain, possible, hypothèses...
- En pathologie tumorale, éléments du pronostic pTNM...
- Codage des lésions (épidémiologie...)

## Démarche diagnostique en ACP

### mêmes étapes que la démarche clinique

- renseignements cliniques = interrogatoire
  - > état civil (age, sexe...)
  - > antécédents, prises médicamenteuses
  - > symptomatologie actuelle
  - Endoscopiques...
- lésions cellulaires/tissulaires = Signes cliniques analyse, interprétation et non mesure exacte
- => intégration en un groupement lésionnel connu permettant un diagnostic
- compte-rendu = élément du « Dossier Patient » décrit les différentes lésions conclusion

diagnostic / hypothèses diagnostiques, indications sur potentialité évolutive des lésions éléments permettant d'orienter le pronostic

confrontation pluridisciplinaire anatomo-clinique => permet la prise en charge thérapeutique du patient

# Congélation

Techniques: -30°C / azote liquide

Conservation: congélateur à -80° / azote liquide

### **Indications**

- ✓ Examen extemporané
- ✓ Immunohistochimie sur coupes congelées pour les Ag dénaturés par la fixation
- ✓ Mise en évidence des graisses (pt frais ou formolé)
- ✓ Etudes de biologie moléculaire (ADN, ARN) PCR
- ✓ Banque de tissus cryopréservés

# Microscopie électronique

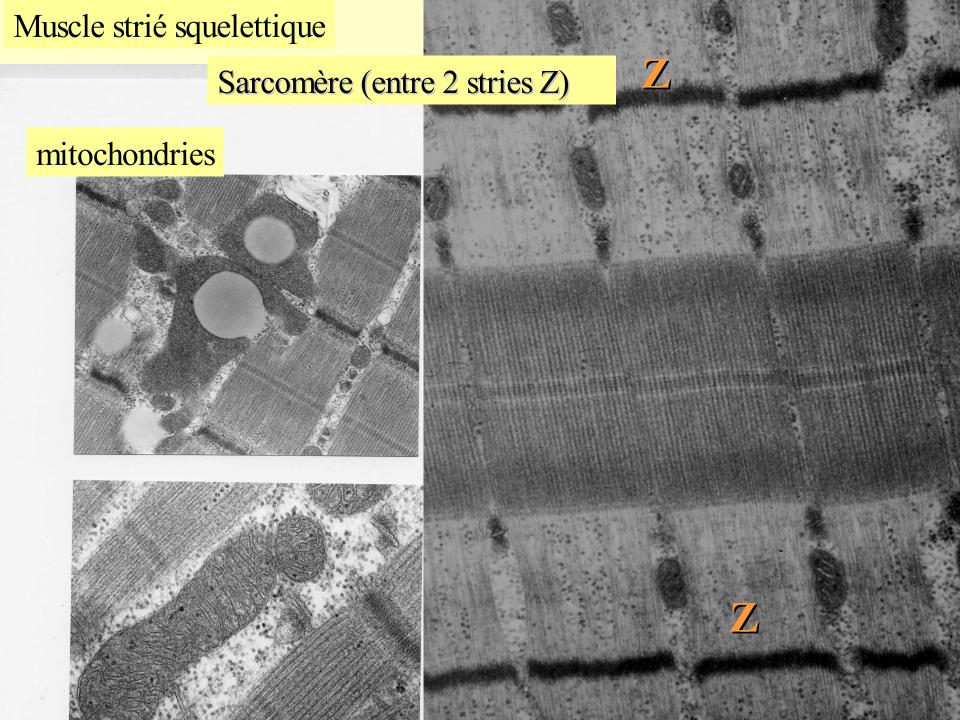
Etude de l'ultrastructure d'une cellule (organites, inclusion, jonctions...), d'un tissu, d'agents pathogènes intra/extra cellulaires (virus)

Technique longue, coûteuse

- ✓ Très petit fragment (1 à 2 mm)
- ✓ Fixation spéciale (glutaraldéhyde), inclusion résine
- ✓ Coupes: 50 nanomètres, ultramicrotome

Indications limitées à des cas particuliers :histiocytose X.. Immunoélectronique possible





# Autopsie / Nécropsie

Autopsie à visée diagnostique / scientifique interrogation registre des refus, famille prévenue effectuée à la demande du clinicien

### Buts

- ✓ Établir la cause de la mort
- ✓ Préciser les lésions responsables des symptômes
- ✓ Vérifier diagnostic clinique / hypothèses diagnostiques
- ✓ Apprécier extension de la maladie, effet des traitements
- ✓ Données épidémiologiques

Examen de tous les viscères (macroscopique, histologique)

Foetopathologie Autopsie médico-légale contexte différent, médecin légiste

## Confrontation clinico-pathologique

Homme de 55 ans Antécédents : HTA traitée

Douleur abdominale intense, à début brutal, sans facteur déclenchant,

Vomissements, diarrhée profuse avec moelæna

Température normale.

Abdomen sensible à la palpation, sans plus, toucher rectal indolore

Choc

Mort subite aux admissions

Diagnostic?

Autopsie

## Les diverses variétés d'autopsie

- Médico-légale
- Médicale (diagnostique)
- Médicale (recherche)
- Universitaire (« don du corps à la science »)
- Şanitaire

- Sans opposition possible
- Information de la famille: absence d'opposition de la personne décédée
- Témoignage écrit de la famille: consentement
- Volontariat du patient (prémortem)





### Rechercher la cause de la mort d'un patient

#### ORIGINAL INVESTIGATION

# Clinical and Autopsy Diagnoses in the Intensive Care Unit

A Prospective Study

Alain Combes, MD, PhD; Mourad Mokhtari, MD; Anne Couvelard, MD; Jean-Louis Trouillet, MD; Jérôme Baudot, MD; Dominique Hénin, MD; Claude Gibert, MD; Jean Chastre, MD

**Background:** Autopsy rates have declined worldwide, but recent retrospective intensive care unit (ICU) data indicate major discrepancies between more than 25% of clinical and autopsy diagnoses.

**Methods:** We conducted a 3-year prospective study of all consecutive autopsies performed on patients who died in a university hospital medical-surgical ICU to determine how many might have benefited from a different level of care, had the autopsy diagnosis been made before death. All clinical diagnoses were compared with autopsy findings at monthly clinical-pathological meetings. Major and minor diagnostic discrepancies were categorized according to the criteria of Goldman et al.

**Results:** Of 1492 patients admitted to the ICU, 315 died, of whom 167 (53.0%) were autopsied. The most common reason (79.7%) for not obtaining an autopsy was family refusal. The mean  $\pm$ SD clinical characteristics were similar for autopsied vs nonautopsied patients, except for shorter length of ICU stay (13 $\pm$ 17 vs 20 $\pm$ 27 days, P=.006),

shorter duration of mechanical ventilation (13±16 vs 19±25 days, *P*=.01), and lower percentage of postcardiac surgery patients (38.9% vs 50.0%, *P*=.05). Among the intensivists' 694 clinical diagnoses, 33 (4.8%) were refuted and 13 (1.9%) were judged incomplete by autopsy findings. Autopsies revealed 171 missed diagnoses, including 21 cancers, 12 strokes, 11 myocardial infarctions, 10 pulmonary emboli, and 9 endocarditis, among others. Major diagnostic errors (class I and class II discrepancies) were made in 53 (31.7%) of 167 patients, with a high percentage of immunocompromised patients also observed among these. Similar percentages of patients with class I and class II errors vs other patients had undergone modern diagnostic techniques during their ICU stay.

**Conclusion:** Even in the era of modern diagnostic technology, regular comparisons of clinical and autopsy diagnoses provide pertinent information that might improve future management of ICU patients.

Arch Intern Med. 2004;164:389-392

### Place de l'ACP dans la recherche

- Biologie moléculaire
  - Hybridation in situ (mise en évidence ac nucléiques viraux)
  - Hybridation in situ fluorescente (FISH), chromogénique (CISH)
     (nb copies d'un segment chromosomique donné)
  - PCR in situ ....
- « Tissue microarray »
   1 bloc comportant des carottes tissulaires de patients différents
- Etude de la signature moléculaire d'une lésion Transcriptome (ARN extraits des tissus), protéome (analyse des protéines)
- Microdissection
- Morphométrie
- Cytométrie en flux
- Lame virtuelle
- Épidémiologie, registre

## Banque de tissus cryopréservés

- Recueil dans le cadre d'un acte thérapeutique biopsie, pièce opératoire (tumorale / non tumorale)
- Objectifs
  - Contribution au diagnostic, au pronostic, à l'adaptation d'une thérapeutique, congélation à visée « sanitaire »
  - Mettre à disposition des chercheurs des échantillons biologiques d'intérêt général
  - Préserver le patrimoine biologique
- Conditions
  - Assurer la qualité des échantillons
  - Respecter la législation

Recommandations pour la cryopréservation de cellules et tissus tumoraux dans le but de réaliser des analyses moléculaires. ANAES *Ann. Pathol, 2001, 21, 184-201* 

## Conditionnement des prélèvements

- Effectué par du personnel formé
  - Choix du prélèvement à congeler (représentatif, nécrose...)
  - Protection du personnel (risques infectieux...)
  - Vérification de la qualité du prélèvement
- Matériel adapté à la cryogénie
- Congélation le plus rapidement possible
  - par immersion du tube dans un fluide réfrigérant
  - la chaîne du froid ne doit pas être rompue
- Viabilité des cellules à préserver s'il y a lieu
- Pour les prélèvements destinés à une analyse de l'ARN importance de la protection contre les ribonucléases gants, matériel stérile, liquide de conservation dépourvu de ribonucléases
- Identification du prélèvement+++
  sur le tube ou le sachet, moyens de marquage adéquats
- Conditions précises de congélation et stockage connues

## Conservation des prélèvements maintien de la chaîne du froid

- Azote liquide ou vapeurs d'azote liquide ou congélateur garantissant une température inférieure à 70°C
- Enregistrement écrit continu de la température des congélateurs
- Stockage dans une pièce fermant à clé et climatisée (pour les congélateurs), ventilée (pour l'azote), avec un système d'alarme garantissant le maintien de la température requise
- Présence d'un appareil de secours
- Procédures de maintenance et en cas de panne

## Aspects réglementaires Lois "BIOETHIQUES"

- Loi 88-1138 relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales (Huriet-Sérusclat), modifiée par les lois 90-86, 91-73 et 94-630
- Lois 94-548, 94-653, 94-654
- Loi n° 2004-800 relative à la bioéthique
- Loi n° 2004-801 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel et modifiant la loi n° 78-17 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés
- Loi n°2004-806 relative à la politique de santé publique (recherches biomédicales)
- Les organes prélevés à l'occasion d'une intervention chirurgicale, pratiquée dans l'intérêt de la personne opérée, peuvent ultérieurement être utilisés à des fins thérapeutiques ou scientifiques
- sans caractérisation génétique
- sauf opposition exprimée par elle, après qu'elle ait été informée de l'objet de cette utilisation
- avec caractérisation génétique d'une personne consentement express écrit

# Archivage

- Obligation légale
  - Conservation CR, lames, blocs
  - Cahier journalier
  - Traçabilité de l'élimination des déchets
- Autres éléments archivés
  - Feuilles de demande d'examen
  - Photos ...

# Risques en ACP

Risques infectieux

Prélèvements frais (non fixés), Liquides +++

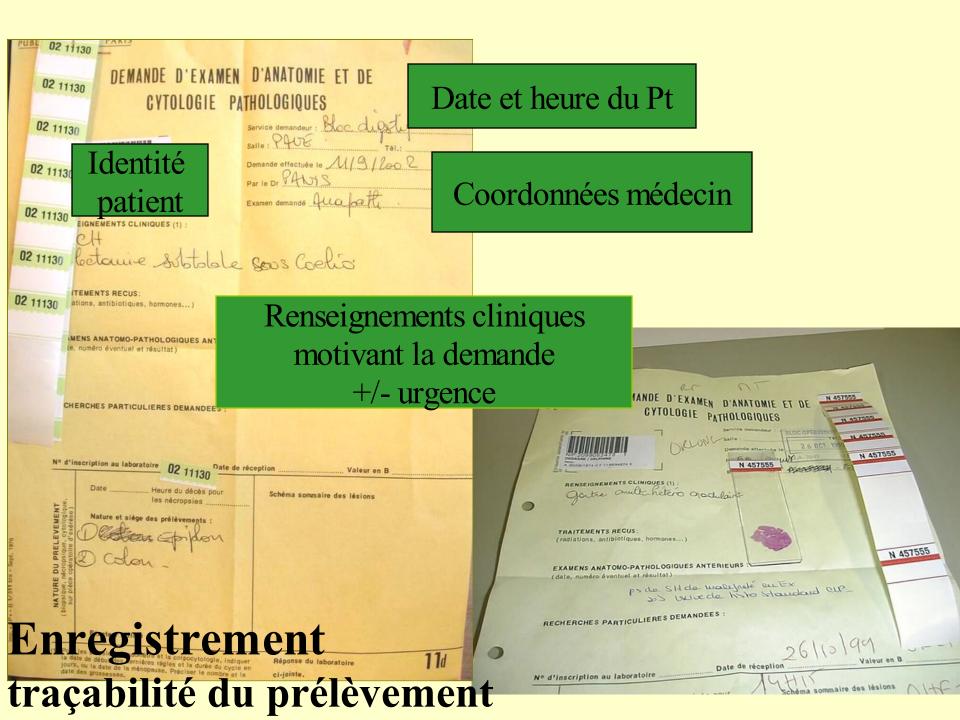
- ✓ Virus : hépatites B, C..., VIH
- ✓ Bactéries : tuberculose...
- ✓ ATNC : Creutzfeldt Jakob (même fixés)
- Risques toxiques
- ✓ personnel: fixateurs, réactifs, solvants...
- ✓ environnement : élimination des déchets

## Assurance Qualité / EPP

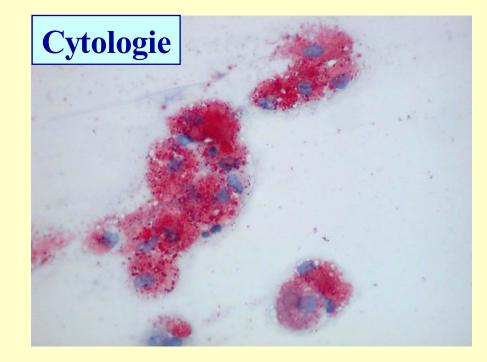
La démarche d'AQ s'impose à tout médecin articles 32 et 72 code de déontologie

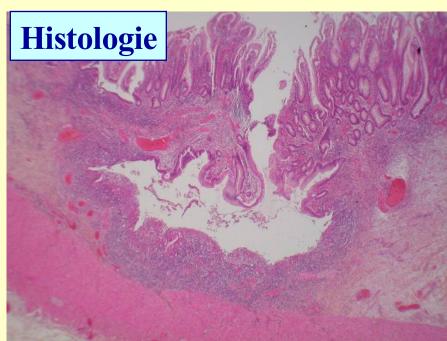
Évaluation des pratiques professionnelles Loi du 13/8/2004 (article 16), décret du 14/4/2005

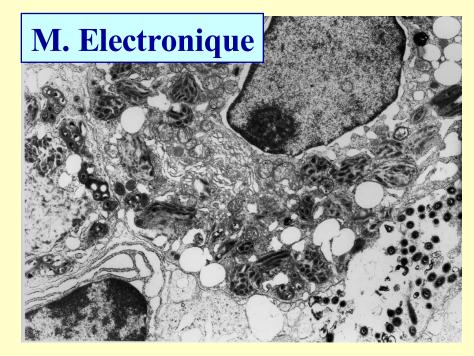
- confidentialité des données CNIL
- traçabilité des prélèvements
- qualité de la technique
- précision du diagnostic
- qualité de l'archivage
- sécurité de la conservation prélèvements congelés
- sécurité du personnel
- protection de l'environnement











# Techniques pouvant être utilisées

- ✓ Macroscopie,
- ✓ Histologie ou Cytologie, colorations....
- ✓ Congélation
  - ✓ examen extemporané
  - ✓ conservation d'un pt congelé (tissuthèque)
- ✓ Immunohistochimie
- ✓ Histoenzymologie
- ✓ Microscopie électronique
- ✓ Biologie moléculaire
  - \* Hybridation in situ
  - \* PCR, FISH, CISH...

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

## Anatomie pathologique générale

Etude des grands processus pathologiques à l'échelon cellulaire et tissulaire

- Pathologie Inflammatoire
- Pathologie vasculaire
- Désordres nutritionnels et métaboliques
- ➤ Pathologie tumorale

## Anatomie pathologique spéciale

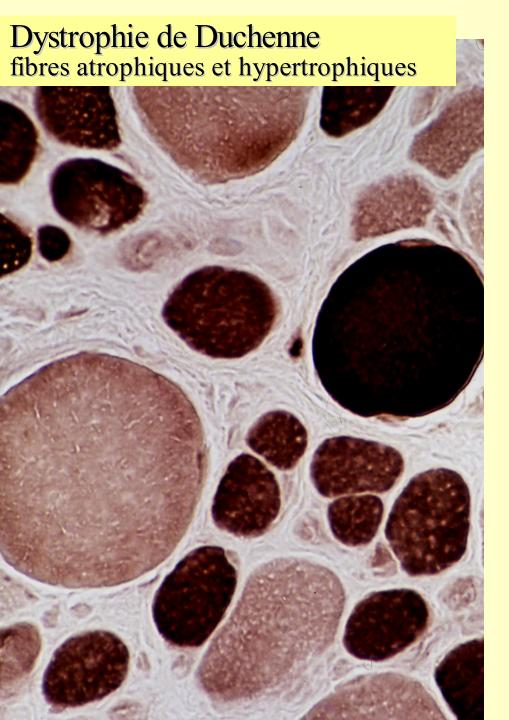
Etude des lésions dans un tissu ou viscère particulier pathologie pulmonaire, digestive, dermatopathologie, néphropathologie, neuropathologie ...

### Lésions élémentaires

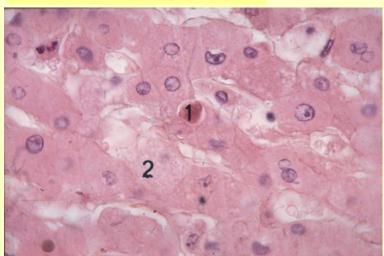
- Adaptation cellulaire et tissulaire (physiologique / pathologique)
  - Atrophie / hypertrophie
  - Aplasie / hypoplasie / hyperplasie
  - Métaplasie
  - Dystrophie
- Mort cellulaire et tissulaire
  - Dégénérescence cellulaire
  - Nécrose cellulaire et tissulaire
  - Apoptose
- Prolifération tumorale

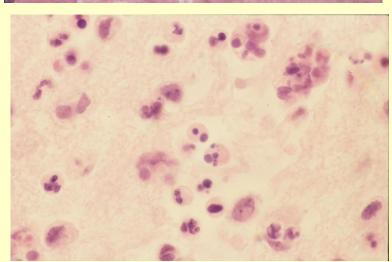
Prolifération cellulaire excessive ayant tendance à persister et à croître

- Tumeur bénigne
- Tumeur maligne, +/- différenciée
  - cellules épithéliales => carcinome
  - cellules conjonctives => sarcome



### Hépatite virale 1 nécrose liquéfaction 2 nécrose coagulation





Inflammation aiguë apoptose des PN