



Item290-Le médecin préleveur de cellules et/ou de tissus pour des examens d'Anatomie et Cytologie Pathologiques : connaître les principes de réalisation, transmission et utilisation des prélèvements à visée sanitaire et de recherche.

Objectifs CNCI		
- Connaître les modalités de transmission de ces prélèvements au laboratoire d'anatomie et 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 morphologique 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.		
Recommandations	Mots-clés / Tiroirs	NPO / A savoir !
- Moyens et objectifs de l'anatomie pathologique en médecine - Collège des enseignants d'anatomopathologie - Inserm - Legifrance	- examen extemporané en cancérologie - cadre législatif	- fiche de renseignement - orientation des prélèvements

A. TRANSMISSION DES PRELEVEMENTS AU LABORATOIRE D'ANAPATH

Critères de qualité d'un prélèvement type biopsie

- taille suffisante (ex : Horton)
- nombre de prélèvement (ex : prostate)
- choix de la zone de prélèvement : hors zone nécrotique ou hémorragique (ex : ulcères)
- préservation des tissus
- repérage

Acheminement

- délais brefs
- respect des règles de fixation
- demande d'examen renseignée

Au laboratoire

- enregistrement
- numéro d'identification unique

Fiche de renseignement

- systématique pour chaque prélèvement
- remplie par le médecin prescripteur
- **informations**
 - identité du patient
 - siège, date et nature du prélèvement
 - motif du prélèvement ± hypothèses diagnostiques
 - aspect macroscopique du prélèvement (vue/endoscopie/imagerie/toute technique antérieure)
 - atcds du patient
 - atcds de prélèvement
 - traitements reçus par le patient
 - nom et coordonnées du médecin

B. TECHNIQUES MORPHOLOGIQUES - PRINCIPES DE BASE

Cytologie

- **principe** : étude de cellules isolées ou d'amas cellulaire
- **méthodes de prélèvement**
 - recueil de liquide spontanément émis : urine, expectoration, fistule, drain
 - raclage, brossage, écouvillonnage, aspiration de cellules desquamant spontanément (col utérin, bulle cutané-muqueuse, bronches, voies biliaires, aspiration après lavage broncho alvéolaire)
 - ponction à l'aiguille d'un liquide (épanchement de séreuse ou articulaire, liquide céphalo- rachidien, kyste, collection)
 - ponction à l'aiguille d'un organe ou d'une tumeur (ganglion, nodule thyroïdien ou mammaire)
 - apposition d'un tissu (pièce opératoire, biopsie) sur une lame
- **techniques d'étude**
 - étalement des cellules sur lames de verre
 - fixation des étalements
 - coloration au May-Grunwald-Giemsa
 - séchage à l'air
 - coloration de Harris-Schorre ou Papanicolaou (FCV)
 - immersion dans l'alcool-éther
 - ou application d'un aérosol de laque
 - étalement des cellules en monocouche
 - cytocentrifugation
 - sur lame de verre
 - ou fixation et inclusion en paraffine
- **limites**
 - résultats souvent partiels : ex : distinction phénomènes inflammatoires et régénératifs
 - pas d'analyse architecturale (histologie++)
 - → souvent examen de dépistage ou d'orientation diagnostique avant histologie++ (hors hémato)

Histologie

- **principe** : étude des tissus (formé d'un ensemble de cellules), notamment leur architecture, structure et rapport entre eux.
- **méthodes de prélèvement**
 - **biopsie** ponction : aiguille coupante ou trocart → cylindre de tissu = "carotte" à l'aveugle sous repérage écho/scanner
 - **biopsie** chirurgicale sous contrôle de la vue **biopsie** partielle ou **biopsie** exérèse per endoscopique
 - **pièce opératoire**
 - **autopsie** = nécropsie → cadavre
 - médico-légale : sur ordre de justice
 - à but scientifique
- **techniques d'étude**
 - **plusieurs étapes**
 - ± prélèvements pour cytologie ou techniques particulières (congélation,
 - fixation
 - pour microscopie électronique, mise en culture pour étude cytogénétique ou suspension pour cytométrie de flux)
 - étude macroscopique
 - fixation
 - inclusion en paraffine
 - confection de coupes
 - coloration
 - **étude macroscopique**(photographies, schéma)
 - aide pronostique (taille et localisation)
 - oriente étude microscopique : zone lésée, aspect macroscopique sain et limites d'exérèse
 - **fixation**
 - conservation de la morphologie cellulaire
 - **précautions** :
 - volume de fixateur = 10 x pièce opératoire
 - grand récipient pour éviter déformation
 - organes creux ouverts et lavés / organes pleins coupés et tranchés
 - **imprégnation et inclusion**
 - déshydratation des tissus
 - inclusion en paraffine
 - **coupe au microtome**
 - **coloration** réhydratation **coloration** usuelle HES colorant basique nucléaire : hématoxyline/hématoxyline (H) colorant acide cytoplasmique : éosine (E)/érythrosine/phloxine safran (S) pour le collagène colorants spéciaux PAS et bleu Alcian : mucines (muqueuse intestinale) rouge congo : dépôts amyloïdes (amylose) von Kossa : sels de calcium Perls : hémossidérine (surcharge en fer/hémochromatose) Fontana-Masson : mélanine (naevus) Weigert : fibres élastiques (Horton) trichrome de Masson : collagènes Ziehl : mycobactéries (tuberculose) Grocott : champignons (aspergillus) Whartin-Starry : bactéries (helicobacter Pylori) Gram : bactéries (distinction gram+ et gram-)

Immunohistochimie

- **principe** : mise en évidence d'Antigènes (Ag) cellulaires (membranaires, cytoplasmique, nucléaires) ou extra-cellulaires via des anticorps (Ac) dirigés contre eux
- **méthodes de prélèvement** : cytologique (immunocytochimie) ou coupes de tissus congelés ou fixés
- **techniques d'étude**
 - **immunofluorescence directe**
 - mise en évidence de dépôts tissulaires d'immunoglobulines et complément
 - biopsie rénale (néphropathie) ou cutanée (dermatose bulleuse)
 - **méthode immunoenzymatique indirecte**
- **méthodes d'amplification** : polymères avec plusieurs Ac, ↑ temps d'incubation, etc.
- **indications** :
 - **intérêt diagnostique** : classification tumorale, mise en évidence d'agents infectieux
 - **intérêt pronostique**
 - **intérêt thérapeutique** : mise en évidence de cibles thérapeutique (Her2 et cancer du sein)

Hybridation in situ

- **principe** : localisation d'une séquence de nucléotides connue mono-brin sur une coupe histologique
- **méthode d'étude** :
 - dénaturer la molécule à étudier en la chauffant pour la rendre mono-brin (ADN)
 - choisir une sonde complémentaire
 - marquage d'une sonde
 - par produit fluorescent : méthode FISH
 - par isotopes radioactifs révélés par autoradiographie
- **indications** :
 - cancer du sein : recherche d'une amplification de l'oncogène Her2
 - tumeurs de vessie : recherche de monosomie 9p21 ou polysomies 3, 7
 - lymphomes : recherche de translocation chromosomique

C. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE NON MORPHOLOGIQUE

Clonage d'expression : permet de produire des protéines en grande quantité pour ensuite les analyser = préalable à de nombreuses techniques de biologie moléculaire

Techniques

- **PCR** : amplification en chaîne par polymérase → détection du VIH ou des virus des hépatites B, C, D
- **électrophorèse (EPS)** : séparation des protéines en fonction de leur charge électrique ± taille (à charge identique) → recherche d'immunoglobulines poly/monoclonales
- **micro arrays** = puces à ADN : permet d'analyser le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule par rapport à un échantillon de référence → cancérologie et typage tumorale pour identifier une signature d'un type cellulaire
- **Southern blot** : digestion de l'ADN par des enzymes de restriction, séparation des fragments par électrophorèse, hybridation par une sonde spécifique, lavage puis auto-radiographie
- **Northern blot** : dérivé du southern blot qui permet de détecter et quantifier un ARN
- **Western blot** : dérivé du southern blot qui permet de détecter et quantifier une protéine donnée → confirmation de test VIH
- **spectrométrie de masse** : analyse du protéome en séparant les protéines selon leurs propriétés chimiques et leur masse moléculaire

D. EXAMEN EXTEMPORANE

Objectif : orienter l'acte chirurgical avec résultat < 30 min

Principales indications

- distinction inflammatoire/tumorale et bénin/malin
- déterminer si biopsie en zone utile
- évaluer si les limites de résection sont saines

Principe de réalisation

- examen dès prélèvement, sans fixation
- étude macroscopique
- coupe au cryomicrotome = cryostat
- coloration rapide (ex : bleu de toluidine)

Limites

- morphologie tissulaire moins bonne (congélation → altération morphologie cellulaire)
- examen partiel (< 30 min après le prélèvement...) → **diagnostic de présomption**
- impossible sur tissus calcifiés (cryostat inutilisable)

E. PRELEVEMENTS DANS LE CADRE DE LA RECHERCHE

Cadre réglementaire : loi du 6 août 2004 relative à la bioéthique modifiée par Loi n° 2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine

- accord de la CNIL : données anatomopathologiques (système informatisé de gestion de laboratoire) exploitées de manière anonyme
- disparition du terme de "recherche biomédicale" → remplacé par "recherche impliquant la personne humaine"
- **3 catégories de recherches** :
 - recherches interventionnelles qui comportent une intervention sur la personne non justifiée par sa prise en charge habituelle
 - recherches interventionnelles qui ne portent pas sur des médicaments et ne comportent que des risques et des contraintes minimales
 - recherches non interventionnelles dans lesquelles tous les actes sont pratiqués et les produits utilisés de manière habituelle, sans procédure supplémentaire ou inhabituelle de diagnostic, de traitement ou de surveillance.
- **Examen génétique à des fins de recherche scientifique** : autorisé si
 - information claire loyale et appropriée sur le projet de recherche,
 - \emptyset opposition (si mineur ou un majeur en tutelle, opposition exprimée par titulaires de l'autorité parentale ou tuteur. si majeur hors d'état d'exprimer son consentement et ne faisant pas l'objet d'une tutelle, opposition exprimée par personne de confiance)
 - dérogation à l'obligation d'information
 - si la personne concernée ne peut pas être retrouvée. Dans ce cas, le responsable de la recherche doit consulter, avant le début des travaux de recherche, un comité de protection des personnes qui s'assure que la personne ne s'était pas opposée à l'examen de ses caractéristiques génétiques et émet un avis sur l'intérêt scientifique de la recherche.
 - si la personne concernée a pu être retrouvée, il lui est demandé, au moment où elle est informée du projet de recherche, si elle souhaite être informée en cas de diagnostic d'une anomalie génétique grave.
 - non applicable aux recherches dont les résultats sont susceptibles de permettre la levée de l'anonymat des personnes concernées
- **Prélèvements effectués sur personnes décédées**: arrêté du 16 août 2007
 - modèle de dossier avec protocole décrivant
 - programme de recherche
 - nature et nombre des prélèvements envisagés.
- **Recherche à partir d'éléments biologiques déjà prélevés**= utilisation secondaire
 - autorisée si préalablement à cette nouvelle utilisation la personne sur laquelle a été opéré ce prélèvement ou cette collecte, a été dûment informée de cette autre fin, sans s'y être opposée.
 - dérogation à l'obligation d'information si
 - impossibilité de retrouver la personne concernée,
 - ou CPP, consulté par le responsable de la recherche, n'estime pas cette information nécessaire.
 - impossible si tissus ou cellules germinaux.

Cadre "matériel"

- prélèvements cryopréservés++
- infrastructure lourde, garantissant la rapidité de congélation,
- contrôle qualité des prélèvements
- conditions de conservation

Cadre "éthique"

- information du patient,
- gestion du consentement (après information claire, loyale et appropriée, révocabilité à tout moment sans conséquence),
- procédures d'assurance qualité
- transparence des règles d'organisation, de fonctionnement et d'utilisation des prélèvements conservés.

Cadre "médical"

- nécessite
 - informations cliniques sur le malade,
 - informations morphologiques (macroscopie, localisation examens d'imagerie)
 - informations sur les échantillons (nature, quantité, conditions de collecte, de préparation, de conservation et d'utilisation).