

Histopathologie cutanée : cytodiagnostic et biopsie cutanée

La biopsie cutanée et le cytodiagnostic sont des gestes simples, de réalisation aisée, qui peuvent grandement contribuer au diagnostic dermatologique à deux conditions :

- d'une part, de respecter les précautions de prélèvement nécessaires à une étude morphologique de bonne qualité,
- d'autre part, de choisir précisément les indications, car tous les diagnostics ne sont pas faits par ces examens.

L'interprétation des comptes rendus apparaît souvent difficile, étroitement dépendante de la confrontation anatomo-clinique surtout pour les dermatoses non tumorales.

Cytodiagnostic cutané

TECHNIQUE DE PRÉLÈVEMENT

Matériel

- Un vaccinostyle de forme triangulaire à base large, ou une curette plate.
- 4 à 6 lames de verre.

Procédure

- Aucune application préalable sur la lésion à prélever, ni anesthésie locale.
- Choisir une lésion vésiculo-bulleuse récente ou une ulcération de moins de 48 heures, non infectée.
- En cas de lésion vésiculo-bulleuse, ôter le toit de la lésion avec le bord coupant du vaccinostyle. Gratter le fond et les bords de la lésion avec le côté du vaccinostyle jusqu'à faire saigner légèrement le fond.
- Étaler le matériel de grattage sur les lames de verre, en essayant d'obtenir 4 à 6 lames pour une lésion.
- Laisser sécher les lames à l'air.
- La lésion grattée ne nécessite aucun soin local particulier.

Précautions pratiques

- La réalisation du prélèvement est très bien supportée par les patients sauf sur des ulcérations muqueuses parfois douloureuses.
- Le grattage d'une lésion sèche, croûteuse, est voué à l'échec par absence de cellules analysables sur les étalements.
- Le grattage d'une lésion infectée ramène un matériel inflammatoire et nécrotique qui ne permet pas une bonne étude cytologique.

- Le grattage d'une lésion ancienne, datant de plus de 48 heures, est rarement contributif en cas de dermatose virale aiguë, car l'effet cytopathogène viral n'est plus détectable en raison de la nécrose secondaire des cellules infectées.

ACHEMINEMENT DANS LE SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

- Pas de précaution d'acheminement autre qu'un emballage cartonné ou une pochette protégeant les lames de verre pour éviter qu'elles soient cassées pendant le transport.
- Remplir une demande d'examen d'anatomie pathologique en indiquant :
 - Nom, prénom, date de naissance du malade
 - Service de consultation ou d'hospitalisation.
 - Nom du médecin préleveur.
 - Date du prélèvement.
 - Siège du prélèvement en attribuant une numérotation différente à chaque lésion si plusieurs lésions ont été prélevées.
 - Renseignements cliniques : date d'apparition, aspect clinique et étendue des lésions, diagnostics envisagés, terrain particulier, etc.
 - Caractère urgent éventuel et numéro de téléphone pour transmettre le résultat.
 - Délai pour l'obtention du résultat : 24 à 48 heures en moyenne, ou moins d'une heure en cas d'urgence pour un résultat téléphoné.

INDICATIONS ET RÉSULTATS

Dermatoses virales épidermotropes du groupe herpès-varicelle-zona

Le cytodiagnostic met en évidence l'effet cytopathogène du virus dans les cellules épithéliales malpighiennes cutanées ou muqueuses : gigantisme cellulaire, multinucléation et inclusions caractérisant les cellules ballonisantes de Unna (*fig. 1*).

Il est positif dans des lésions récentes non remaniées datant de moins de 48 heures en cas d'herpès, de varicelle ou de zona.

Les faux négatifs sont dus le plus souvent au caractère trop tardif du prélèvement et aux remaniements nécrotiques et inflammatoires.

En cas d'infection virale chronique chez les sujets immunodéprimés, le cytodiagnostic est pratiquement toujours positif, même sur des lésions anciennes, du fait de la persistance locale du virus.

La fiabilité du cytodiagnostics est grande quand il est correctement effectué, et les faux positifs sont exceptionnels.

En aucun cas, il ne permet de distinguer le type de virus en cause, herpès 1, herpès 2, ou varicelle-zona : l'effet cytopathogène est identique pour tous les virus de ce groupe.

Le typage précis du virus nécessite un prélèvement virologique.

Dermatoses bulleuses auto-immunes avec acantholyse (groupe des pemphigus)

Le cytodiagnostics met en évidence le phénomène d'acantholyse qui est bien caractéristique en cas de pemphigus vulgaire, mais plus difficile à reconnaître en cas de pemphigus superficiel (fig. 2).

Les cellules malpighiennes acantholytiques ont un gros noyau hyperchromatique entouré d'un halo clair contrastant avec la basophilie du cytoplasme plus condensé en périphérie près de la membrane plasmique.

Les difficultés d'interprétation cytologique sont plus nombreuses que pour les lésions virales, surtout sur les muqueuses où les remaniements inflammatoires modifient l'aspect des cellules épithéliales.

Remarques

- Le cytodiagnostics à la recherche d'un pemphigus reste un examen d'orientation diagnostique.
- Il doit être complété par une biopsie de bulle et une biopsie péribulleuse pour étude en immunofluorescence afin d'obtenir un diagnostic de certitude pour débiter le traitement (corticothérapie par voie générale).
- Quand le pemphigus est connu, le cytodiagnostics permet de confirmer une récurrence, surtout sur une muqueuse plus difficile à biopsier, et d'adapter le traitement.

Autres dermatoses vésiculo-bulleuses et pustuleuses

Le cytodiagnostics négatif permet d'éliminer les étiologies précédentes (herpès-varicelle-zona et pemphigus) à condition d'avoir effectué un prélèvement correct sur des lésions

représentatives de la dermatose : bulle d'apparition récente et non remaniée par des phénomènes inflammatoires ou nécrotiques ou par une surinfection.

Biopsie cutanée

PRINCIPES GÉNÉRAUX

La réalisation pratique d'une biopsie cutanée peut se faire selon trois méthodes :

- biopsie au punch (dont le diamètre varie de 2 à 6 mm),
- biopsie au bistouri,
- biopsie chirurgicale profonde.

Les modalités de fixation du fragment cutané au moment du geste biopsique conditionnent les possibilités techniques ultérieures.

Dans la plupart des cas, il suffit d'immerger le fragment dans une solution aqueuse à 10 p. 100 de formol tamponné.

Quand la biopsie est de petite taille, d'épaisseur inférieure à 1 cm, et susceptible d'être acheminée dans un délai de 24 heures, la fixation dans le liquide de Bouin aqueux reste une excellente procédure pour la technique histologique de routine.

Les autres modalités initiales de prélèvement sont la congélation, soit immédiate dans l'azote liquide, soit différée par immersion dans un milieu de transport le liquide de Bens Michel, ou beaucoup plus rarement la fixation en glutaraldéhyde.

TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT

Choix du site biopsique

Dermatoses inflammatoires : choisir une lésion récente, non remaniée par des phénomènes de surinfection ou par de la nécrose.

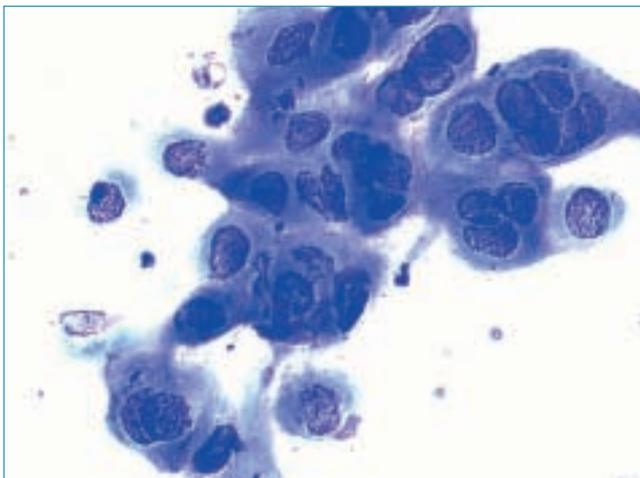


Fig. 1. Cytodiagnostics : cellules ballonnantes de Unna

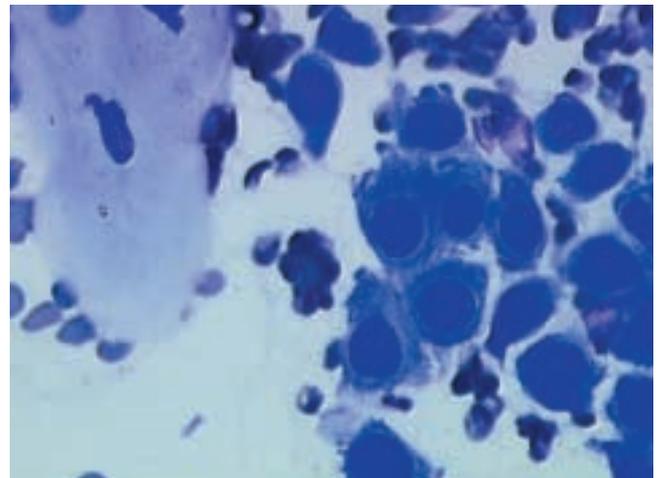


Fig. 2. Cytodiagnostics : cellules acantholytiques

Pathologie tumorale : prélever en bordure, à cheval sur la peau normale et la zone tumorale, ou dans une zone non remaniée de la tumeur.

Procédure

- Anesthésie locale
 - Une injection de xylocaïne à 1 p. 100 (1 à 3 ml).
 - Dans les territoires où existe un risque de saignement, utiliser de la xylocaïne adrénalinée à 1 à 2 p. 100 en respectant les contre-indications : jamais d'adrénaline si la biopsie est faite sur les extrémités, doigts, orteils, oreilles, nez, verge.
 - Attendre 5 minutes.
 - Biopsie au bistouri : elle nécessite une suture.
 - Biopsie au punch : le diamètre du punch varie de 2 à 6 mm ; à partir de 4 mm, il faut un point de suture.

Précautions particulières

- La biopsie d'une lésion profonde hypodermique ou d'un nodule sous-cutané est réalisée au bistouri de préférence.
- La biopsie profonde avec un punch est possible à condition de couper avec des ciseaux longs la base du fragment avant de l'extirper.

CONDITIONS D'ACHEMINEMENT ET CHOIX DU FIXATEUR

Un fixateur est un milieu qui préserve les structures tissulaires pour l'étude morphologique ultérieure. Selon les structures à étudier, le conditionnement de la biopsie sera différent.

Le choix du liquide d'immersion du fragment biopsique doit être impérativement décidé au moment du prélèvement selon l'étude à laquelle est destinée la biopsie : une fixation inadaptée rend le prélèvement inutilisable et imposera de la refaire.

Liquide de Bouin (aqueux)

- Indications
 - Étude histologique standard.
 - Fragment biopsique de moins de 1 cm d'épaisseur.
- Avantages
 - Action rapide : une fixation de quelques heures est suffisante.
 - Permet de techniquer rapidement la biopsie : à utiliser en cas de résultat urgent.
 - Identification aisée du liquide de couleur jaune.
 - Permet les techniques complémentaires usuelles : histochimie et la plupart des marqueurs immunohistochimiques.
- Inconvénients
 - Durcissement des tissus : ne pas dépasser 24 heures de fixation.
 - Empêche quelques techniques particulières : certains marqueurs immuno-histochimiques (collagène IV, CD34) et toutes les techniques d'hybridation *in situ* et de PCR *in situ*.

Formol (tamponné à 10 p. 100)

- Indications
 - Étude histologique standard.
 - Fragment biopsique dont l'épaisseur dépasse 1 cm.
- Avantages
 - Permet une conservation prolongée des tissus.
 - À utiliser quand les délais d'acheminement dépassent 24 heures ou lorsque la biopsie est susceptible de nécessiter des études complémentaires ultérieures non déterminées au moment du prélèvement.
 - Permet de nombreuses techniques complémentaires : histochimie, immunohistochimie (marqueurs tumoraux, sauf les sous-populations lymphocytaires), hybridation *in situ* et PCR *in situ*.
- Inconvénients
 - Temps de fixation plus long (12 à 24 heures).
 - Liquide incolore qui risque d'être confondu avec d'autres solutés (eau, sérum physiologique, etc.).

Glutaraldéhyde

- Indications
 - Étude en microscopie électronique.
 - Les applications diagnostiques sont très limitées en pratique dermatologique.
 - La durée de la technique est longue et le délai de réponse dépasse souvent un mois.
- Procédure
 - L'immersion doit impérativement être faite sur le lieu du prélèvement sans aucun délai et les fragments biopsiques ne doivent pas dépasser 1 mm de côté.
 - En pratique il faut se procurer au préalable le fixateur auprès du service d'anatomie pathologique ou du service d'histologie et l'y acheminer dans un délai inférieur à une heure.

Congélation

- Indications
 - Recherche de dépôts d'immunoglobulines et/ou de compléments extracellulaires (sur les membranes basales) par une technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps anti-Ig7, IgG et anti-C3.
 - Étude des sous-populations lymphocytaires (phénotypes) par une technique d'immunoperoxydase utilisant des anticorps anti-pan B (CD20) et anti-pan T (CD3), anti-CD30.
- Procédure
 - Étude en immunofluorescence directe : le fragment biopsique est mis dans un petit tube sec en plastique dur pourvu d'un bouchon vissé résistant à la congélation.
 - Étude des sous-populations lymphocytaires : le fragment biopsique est directement placé dans le tube à congélation selon la même technique.

– Le tube est identifié à l'aide d'une étiquette ficelée indiquant le nom du malade (étiquette collée à une extrémité d'un fil de 30 cm dont l'autre extrémité est nouée autour du bouchon).

– Le tube est ensuite immergé dans de l'azote liquide contenu soit dans un conteneur soit dans une bouteille thermos et dans ce cas le couvercle ne doit surtout pas être vissé (pour éviter tout risque d'explosion).

– Le conteneur d'azote ou la bouteille thermos contenant le ou les tubes de prélèvement doit être acheminé dans le service d'anatomie pathologique avant que l'azote liquide ne soit totalement évaporé (lorsque l'on dispose d'une bouteille thermos, un délai d'une nuit entraîne l'évaporation de l'azote et aboutit à la perte du prélèvement par réchauffement).

Utilisation du liquide de transport ou liquide de Bens Michel

• Cas particuliers

Indications : Uniquement pour l'étude en immunofluorescence directe à la recherche de dépôts d'immunoglobulines et de complément.

Procédure : se procurer les flacons auprès du service d'anatomie pathologique et les conserver au réfrigérateur à + 4° C s'ils ne sont pas utilisés immédiatement (délai de conservation : 6 mois minimum).

Immerger le fragment biopsique dans le liquide de transport.

L'acheminement peut être différé et fait à température ambiante dans un délai maximal de 24 à 48 heures.

Intérêt : permet de conserver dans de bonnes conditions une biopsie cutanée quand on ne dispose pas d'azote liquide, et permet l'envoi du prélèvement comme un courrier ordinaire.

Autres méthodes

Acheminement dans du sérum physiologique.

Cette procédure peut permettre de différer la congélation d'une biopsie pour en faciliter l'expédition, notamment pour l'étude des marqueurs lymphocytaires en immunoperoxydase et à condition d'avoir contacté au préalable le service d'anatomie pathologique qui effectue la technique pour que l'acheminement du prélèvement soit le plus court possible (moins d'une heure).

Certaines techniques très spécialisées nécessitent des conditions particulières de prélèvement : immunomicroscopie électronique pour les biopsies cutanées, études enzymatiques pour certaines biopsies musculaires, recherches virales, etc.

Dans tous les cas, il faut téléphoner au préalable dans le laboratoire où doit être acheminée la biopsie afin d'obtenir les indications précises sur les méthodes de prélèvement et de transport.

INDICATIONS DES MÉTHODES HISTOPATHOLOGIQUES

Étude histologique standard

• Fixation

- Liquide de Bouin.
- Formol.

• Colorations

- Hématéine-éosine.
- Hématéine-phloxine-safran.

• Applications

Diagnostic morphologique des lésions inflammatoires et tumorales.

• Précautions particulières

L'étude histologique standard doit toujours être associée aux autres techniques complémentaires dont l'interprétation en dépend.

La congélation seule ne permet pas une bonne analyse morphologique et doit toujours être associée à une étude histologique standard d'un fragment biopsique fixé en Bouin ou en formol.

Études histochimiques

• Principes

Ce sont des colorations complémentaires simples, qui permettent de mettre en évidence des structures non ou mal visualisées par la coloration standard sur des biopsies fixées dans le liquide de Bouin ou dans le formol.

Elles ne sont jamais effectuées systématiquement et sont décidées par l'anatomopathologiste selon le diagnostic recherché et en fonction des renseignements cliniques communiqués.

• Applications

– Recherche de germes

PAS : micro-organismes, champignons, bactéries.

Ziehl : mycobactéries.

Gram : caractérisation des bactéries.

Whartin-Starry : mise en évidence de spirochètes et diverses bactéries.

Giemsa : bactéries, corps de Leishman (leishmanioses cutanées), champignons.

Grocott : champignons (et pneumocystis carinii : exceptionnel dans les téguments).

– Recherche de dépôts

Amylose : rouge Congo, violet de Paris, thioflavine.

Fer : Perls.

Calcifications : Von Kossa (fixation dans le formol).

Mucines : bleu alcian, bleu de toluéidine.

– Visualisation de structures particulières

Membranes basales : PAS, Gordon.

Fibres élastiques : orcéine.

Fibrose : trichrome de Masson.

Études immunohistochimiques

• Immunofluorescence directe (IFD)

- Procédure : congélation.
- Applications

Diagnostic des dermatoses bulleuses : groupe des pemphigoïdes, groupe des pemphigus, dermatite herpétiforme, épidermolyse bulleuse acquise, porphyrie cutanée tardive afin de mieux classer une dermatose bulleuse difficile à caractériser par les autres méthodes, lupus.

- Immunoperoxydase

- *Indications*

Fixateur classique (Bouin, formol) : permet l'étude de différents marqueurs choisis par l'anatomopathologiste en fonction du problème diagnostique (identification d'une tumeur indifférenciée, d'un mélanome, d'une histiocytose langerhansienne, etc).

Congélation : permet l'étude des sous-populations lymphocytaires aidant à caractériser un lymphome.

Autres techniques

- Étude par hybridation *in situ*

- *Indications*

Technique peu courante qui permet de rechercher certains types de virus (HPV, EBV, etc.) ou des acides nucléiques selon les sondes disponibles dans les laboratoires.

- *Procédure*

La fixation de la biopsie dans du formol est indispensable, car le liquide de Bouin empêche d'effectuer ces techniques.

La congélation demeure nécessaire pour certaines sondes.

- Étude ultrastructurale

- *La microscopie électronique* permet l'étude des différents constituants cutanés (voir choix du fixateur : glutaraldéhyde).

En routine, son emploi est limité au diagnostic de certaines affections caractérisées par un marqueur ultrastructural que des techniques plus simples ne permettent pas de détecter (troubles constitutionnels de la kératinisation, certaines maladies bulleuses congénitales, certaines maladies métaboliques).

- *L'immunomicroscopie électronique* est utilisée pour identifier certaines dermatoses bulleuses de classement difficile ou impossible par les techniques usuelles (procédure : contacter au préalable le laboratoire concerné).

- Techniques de biologie moléculaire

- *Indications*

Recherche d'un réarrangement génique montrant le caractère monoclonal de cellules lymphoïdes.

- *Procédure*

Congélation du fragment biopsique.

Choix de la méthode biopsique

Il dépend du diagnostic recherché et du site des lésions.

En règle générale, les dermatoses inflammatoires bénéficient de biopsies au punch.

La biopsie au bistouri est préférable pour étudier les lésions vésiculo-bulleuses, l'hypoderme, et pour prélever la plupart des lésions tumorales dont quelques-unes, de diagnostic particulièrement difficile, peuvent nécessiter une biopsie chirurgicale profonde.

De plus, quand la nature auto-immune d'une dermatose vésiculo-bulleuse est envisagée, pemphigus ou pemphigoïde, il est nécessaire de congeler un fragment biopsique prélevé en peau saine péri-bulleuse pour rechercher des dépôts d'immunoglobulines et de complément par une technique d'immunofluorescence directe (IFD) souvent indispensable pour affirmer le diagnostic.

Devant une suspicion de lymphome, il est souhaitable d'effectuer une étude du phénotype lymphocytaire et parfois une étude du réarrangement du récepteur des lymphocytes T par une technique de biologie moléculaire, qui nécessitent toutes deux la congélation du fragment biopsique et son acheminement en laboratoires spécialisés, de telle sorte que ces gestes sont plus souvent effectués en milieu dermatologique hospitalier dont les équipes sont habituées à prendre en charge ces prélèvements dans les meilleures conditions.

Enfin, la suspicion d'une dermatose infectieuse incite d'abord à rechercher un agent pathogène à l'aide des prélèvements microbiologiques appropriés, y compris une biopsie pour broyage permettant de mieux détecter une mycobactérie.

La microscopie électronique, nécessitant une fixation immédiate en glutaraldéhyde, a des indications diagnostiques limitées en pratique à quelques génodermatoses.