

L'APPLICATION DES TECHNIQUES D'IMMUNOHISTOCHIMIE À DES PRÉLÈVEMENTS CYTOLOGIQUES : QUELQUES RÈGLES À RESPECTER

Monique COURTADE-SAÏDI, Charlotte DUBUCS, Céline BASSET,
Dominique D'AURE, Jacqueline AZIZA, Solène EVRARD

monique.courtade-saidi@univ-tlse3.fr

*Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Institut Universitaire
du Cancer (IUC) Toulouse ONCOPÔLE,
1 avenue Irène Joliot Curie, 31059 TOULOUSE CEDEX 9
et*

*Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine Toulouse Rangueil,
133 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex9*

ABSTRACT

Immunocytochemistry (ICC) helps cytologists to perform diagnosis. However, its interest may sometimes be limited by a lack of reproducibility. This latter may be due to a great diversity of samples and of their handling. Harmonization of preanalytic steps is mandatory in order to obtain a good reproducibility. The results may be different according to the nature of the sample: smears, cytopspins or liquid based specimens. It is possible to harmonize the sample's fixation for smears or cytopspins before ICC. The nature of the fixative must be taken into account for liquid-based samples. Indeed, a formalin's based-fixative necessitates heat-induced antigen retrieval (HIAR). Nuclear antibodies necessitate HIAR while it is not mandatory for membranous or cytoplasmic antigens. HIAR must be adjusted for cytological samples (shorter time with high pH-buffers). We present here some examples of ICC with common antibodies used in our laboratory.

KEY WORDS

Immunocytochemistry, Cytology, Pre-analytical

RESUME

L'immunocytochimie (ICC) constitue une aide précieuse pour affiner le diagnostic cytologique. Cependant sa réalisation est parfois limitée par des problèmes de reproductibilité. Une des contraintes est représentée par la diversité des échantillons et de leur préparation. L'harmonisation des étapes préanalytiques constitue un pré-requis indispensable afin d'obtenir une bonne reproductibilité. Les résultats obtenus seront différents selon que l'on travaille sur lame d'étalement, sur cytopspins ou bien à partir de prélèvements fixés en milieu liquide. Il est possible d'harmoniser la fixation de lames d'étalement ou de cytopspins avant la technique d'ICC. Il sera nécessaire de connaître la nature du fixateur s'il s'agit d'un milieu liquide. En effet, le formol justifiera un démasquage antigénique préalable. Certains anticorps nécessiteront obligatoirement un démasquage antigénique, notamment pour les antigènes nucléaires, cela ne sera pas systématiquement nécessaire pour des antigènes membranaires ou cytoplasmiques. Les techniques de démasquage devront être ajustées à la cytologie (temps plus courts avec les pH élevés). Nous présenterons quelques exemples à partir d'anticorps fréquemment utilisés en cytologie.

MOTS CLES

Immunocytochimie, Cytologie, Pré-analytique

INTRODUCTION

Compte tenu de son caractère peu invasif, la ponction cytologique représente une alternative ou bien une approche de première intention pour la caractérisation de tumeurs. Elle convient aussi bien pour l'analyse de liquides d'épanchement ou d'autres liquides biologiques qu'au niveau d'organes solides [1].

Les échantillons biologiques prélevés sont adressés au laboratoire sous différentes formes : lames d'étalement, liquides, recueil en milieu liquide ou dans un liquide fixateur de nature variable. Cette diversité d'échantillons complique la réalisation des techniques d'immunocytochimie (ICC) dans la mesure où les étapes préanalytiques sont difficilement harmonisables et les contrôles positifs ou négatifs ne sont pas toujours disponibles pour valider les techniques.

Pour autant, il est possible d'obtenir de très bons résultats avec les techniques d'ICC dans la mesure où un certain nombre de règles sont respectées. Les protocoles d'immunohistochimie (IHC) sur blocs en paraffine nécessitent une adaptation pour les prélèvements cytologiques. Nous allons détailler ci-dessous les points qui méritent une vigilance particulière.

ECHANTILLONS CYTOLOGIQUES ADRESSES AU LABORATOIRE

Les prélèvements peuvent parvenir au laboratoire sous différentes formes :

- Des lames d'étalement séchées à l'air : ces dernières sont souvent de type classique, sans prétraitement pour augmenter l'adhésion des cellules. Elles sont bien adaptées à une coloration topographique au May-Grünwald-Giemsa. Elles présentent un risque de décollement cellulaire lors de la technique d'ICC, notamment s'il est pratiqué un démasquage antigénique.
- Des prélèvements liquidiens : ces derniers peuvent être traités en cytopspins ou bien par étalement du culot après centrifugation. Ils peuvent bénéficier d'un comptage cellulaire au préalable afin d'ajuster la concentration des cellules. Il est plus facile de maîtriser les étapes de fixation et de conservation des lames. Pour

les techniques d'ICC automatisées il ne faudra pas utiliser de lames cerclées. Les prélèvements très hémorragiques peuvent être traités soit en milieu liquide avec lyse des globules rouges (Cytolyt, Hologic par exemple) soit faire l'objet d'un cytobloc.

- Des prélèvements en milieu liquide : la conservation ou la fixation des cellules est standardisée et permettra d'ajuster plus facilement les techniques utilisées.

Lorsque le matériel est suffisant, des cytoblocs peuvent être réalisés à partir de prélèvements liquidiens ou en milieu liquide. Leur fixation sera comparable à celle des échantillons biopsiques afin de les traiter dans les mêmes conditions que ces derniers. Dans ce cas les techniques d'ICC sont comparables à celles de l'IHC pratiquée dans le laboratoire et nous ne les détaillerons pas.

PRE-REQUIS POUR L'ICC

La nature des lames

Les échantillons doivent être étalés sur des lames adhésives afin de favoriser l'adhésion des cellules. Ceci est particulièrement important pour les anticorps nécessitant un démasquage antigénique à la chaleur. Si les échantillons qui parviennent au laboratoire déjà étalés sur lames le sont sur des lames non adhésives, cela n'empêche pas de réaliser la technique d'ICC en sachant que l'on peut observer un décollement partiel des cellules. Les lames cerclées sont également à proscrire si l'on réalise la technique sur un automate car le cerclage empêche la bonne répartition des réactifs sur la zone d'intérêt. Il faut noter que certaines firmes proposent actuellement des lames cerclées sur la face opposée à l'étalement.

La fixation

Différentes méthodes de fixation peuvent être appliquées, à base d'acétone, d'alcool ou de formol. Il faut en connaître les avantages et les inconvénients. Pinheiro et al 2014 [2] ont publié un essai comparatif sur des étalements et des cytopins entre une fixation de 10 min à l'acétone après conservation des lames séchées à -20°C et une fixation de 30 min à -20°C au méthanol suivie d'une protection des lames au polyéthylène glycol permettant leur conservation à

température ambiante. Cette dernière méthode de fixation était plus performante que la première en termes de préservation de la morphologie et d'intensité de la contre-coloration. Les résultats du marquage étaient comparables entre les deux méthodes. Des étalements de culots de liquides d'épanchement ont montré de bons résultats en ICC avec des anticorps usuels après séchage à l'air et fixation au formol [3]. Cette méthode permet une meilleure richesse cellulaire qu'après un cytobloc qui ne renferme parfois que peu de cellules tumorales. Une autre étude à partir de liquides d'épanchement a montré la fiabilité et une meilleure performance de l'ICC sur des frottis réalisés après fixation à l'éthanol 95% comparée aux cytoblocs fixés soit à l'éthanol 95% soit au formol 4% sur le même échantillon [4]. Le même résultat a été obtenu sur des liquides d'épanchement par l'équipe de Ikeda et al [5]. D'excellents résultats d'ICC ont été obtenus à partir de ponctions cytologiques préparées en milieu liquide lorsqu'elles étaient comparées au résultat histologique définitif [6]. Les antigènes nucléaires sont mieux préservés après fixation formolée qu'à l'éthanol, les antigènes membranaires et cytoplasmiques étant plus résistants et bien préservés par les fixations alcooliques [1]. L'acétone est un fixateur de choix pour les marqueurs hématopoïétiques mais il présente l'inconvénient de mal préserver la morphologie cellulaire [7]. Il est difficile pour une utilisation de routine de faire coexister plusieurs types de fixation en fonction des anticorps utilisés. Aussi, le plus souvent un compromis est réalisé en choisissant un seul type de fixation pour toutes les lames.

Le démasquage antigénique

Il est nécessaire lorsque la fixation fait appel à du formol [3] et pour les antigènes nucléaires. Il est réalisé sur le même principe que celui des prélèvements inclus en paraffine (tampon citrate à pH 6 ou tampon TRIS-EDTA à pH 9 selon les anticorps utilisés) mais avec un temps de démasquage à la chaleur raccourci, n'excédant pas 20 min (si pH 6) ou 10 min (si pH 9) afin d'éviter le décollement des cellules. Par défaut, il est recommandé de tester un tampon à pH 6 car il y a moins de risque de lyse ou de décollement des cellules, et d'utiliser un tampon à pH 9 si le résultat est amélioré. Il n'est pas obligatoire pour des antigènes membranaires ou cytoplasmiques. Cependant, il peut améliorer les résultats pour certains antigènes membranaires comme les antigènes lymphocytaires [4] ou cytoplasmiques [8, 9] en diminuant le bruit de fond.

La dilution des anticorps

Le plus souvent la dilution utilisée en IHC convient à l'ICC. Cependant, certains anticorps nécessitent une dilution plus importante en ICC et cela est adapté au laboratoire. En l'absence de marquage on peut également être amené à concentrer l'anticorps. La diffusion des anticorps pré-dilués préconisés pour les automates permet de contourner cette étape.

La conservation des lames

Des lames séchées à l'air (étalements ou cytopins) peuvent être conservées une semaine à température ambiante dans une boîte de rangement à l'abri de la lumière, au-delà il est recommandé de les conserver à -70°C. Elles peuvent alors être stockées plusieurs années sans que le marquage soit altéré [1].

Les contrôles

L'utilisation de lames témoins est impérative (10). Pour un certain nombre d'anticorps un témoin positif est présent sur la lame ou une lame provenant d'un autre patient dans la même série. Pour des anticorps peu utilisés, l'addition de lames témoins positives stockées au congélateur est nécessaire. Une conservation des antigènes sur du matériel témoin après fixation en milieu liquide a été montrée 40 jours après conservation des lames à +4°C. Il est aussi possible, mais fastidieux, de déposer un témoin positif sur la même lame [10].

Un contrôle de qualité peut être représenté par le même matériel inclus en cytobloc afin de vérifier la performance du marquage cytologique [11].

INTERPRETATION DES RESULTATS

Interprétation

Des faux positifs peuvent être observés quand le fond de la préparation est nécrotique, quand la fixation est insuffisante ou avec l'utilisation d'anticorps polyclonaux. Bien entendu il faut rester critique devant tout marquage inattendu et renouveler si nécessaire la technique avec un contrôle positif et négatif. La

méthode de révélation enzymatique la plus utilisée est la peroxydase comme en IHC. La peroxydase endogène est parfois difficile à inactiver sur des échantillons tels que des étalements médullaires ou bien riches en polynucléaires éosinophiles. Dans ces cas-là on privilégiera une révélation à la phosphatase alcaline.

Performance de l'ICC sur étalements ou cytopspins

Les étapes de la technique sont beaucoup mieux contrôlées sur un automate, ce qui est le cas généralement en routine. La performance (parfois meilleure) de l'ICC a été démontrée sur lames d'étalement en comparaison avec les cytoblocs [3, 4].

Nous présentons sur les **figures 1 et 2** des exemples de comparaison entre des lames d'étalement ou des cytopspins (à partir de matériel en milieu liquide Preservcyt, HOLOGIC) et les cytoblocs correspondants de la même tumeur.

CONCLUSION

Si l'on respecte un certain nombre de règles, l'ICC peut apporter de nombreux renseignements pour le diagnostic de routine. Elle présente l'avantage d'être plus rapide à mettre en œuvre que l'IHC et permet de répondre rapidement. Il faut cependant s'assurer des contrôles positifs pour une interprétation fiable, ce qui n'est pas toujours possible pour des anticorps peu utilisés en routine.

Figure 1 : Comparaison de résultats d'immunocytochimie de tumeurs pulmonaires sur lames d'étalement (A à D) et sur cytoblocs (E à H).

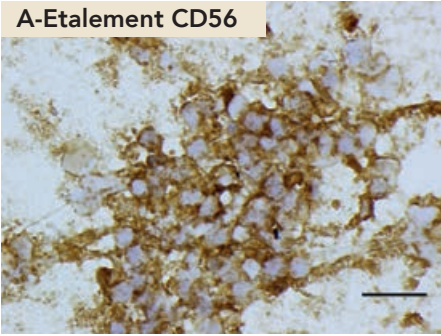
A,E : Anti-CD56 (1/40^{ème}), barre d'échelle 25 µm. Le marquage membranaire est comparable entre le cytobloc et la lame d'étalement ;

B,F : Anti-CK5/6 (1/100^{ème} (B) et 1/50^{ème} (F)), barre d'échelle 50 µm (B) et 100 µm (F). Le marquage membranaire est plus intense sur le cytobloc mais reste bien visible sur lame d'étalement ;

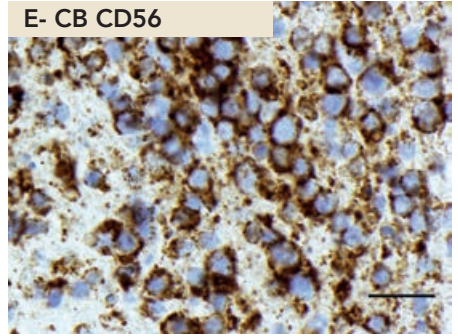
C,G : Anti-p63 (1/100^{ème}), barre d'échelle 25 µm (C) et 100 µm (G). Intense marquage nucléaire sur cytobloc comme sur étalement;

D,H : Anti-TTF1 (1/50^{ème}), barre d'échelle 25 µm. Les marquages sont comparables sur étalement et sur cytobloc.

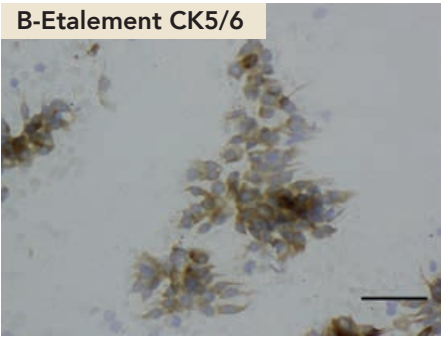
A-Etalement CD56



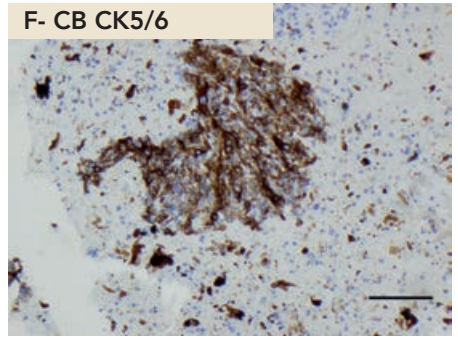
E- CB CD56



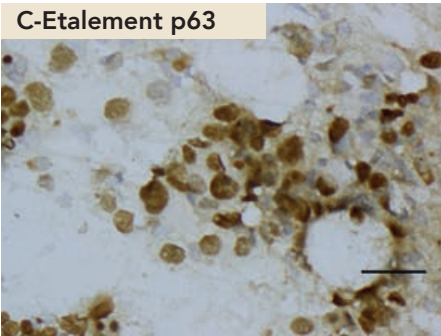
B-Etalement CK5/6



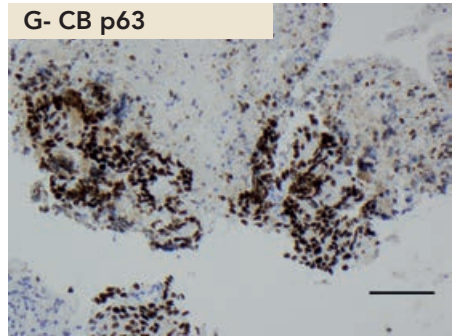
F- CB CK5/6



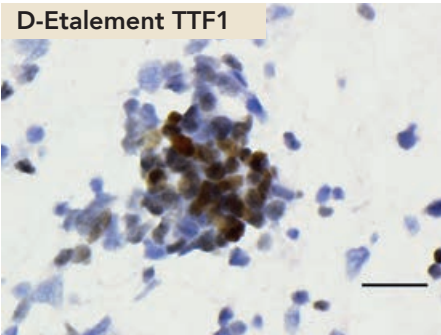
C-Etalement p63



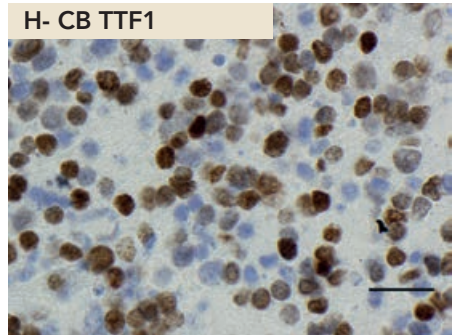
G- CB p63



D-Etalement TTF1



H- CB TTF1



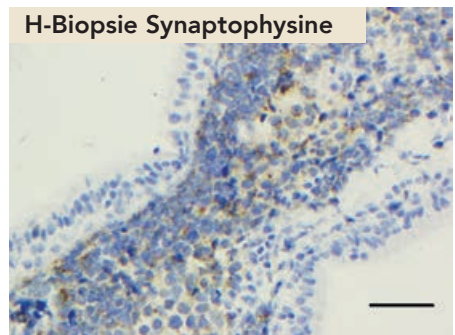
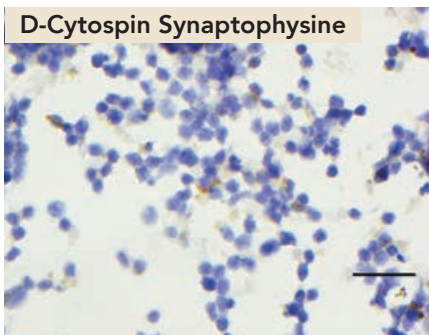
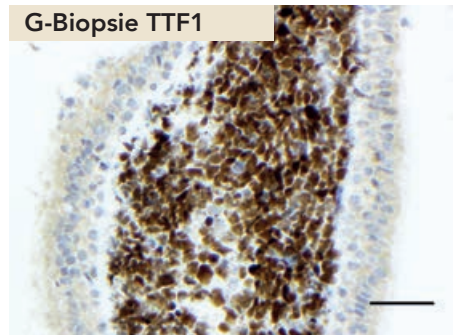
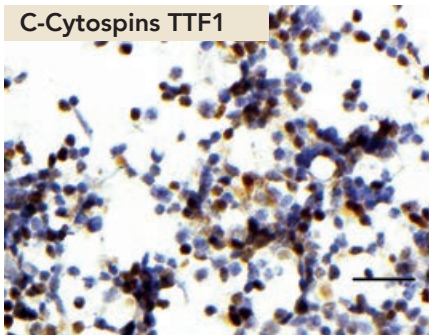
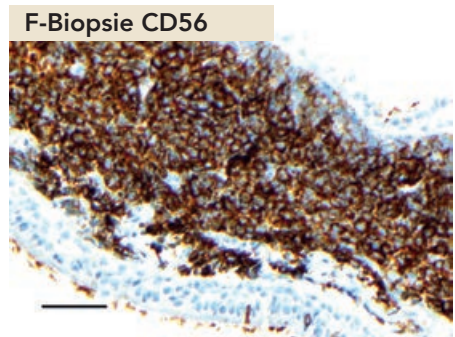
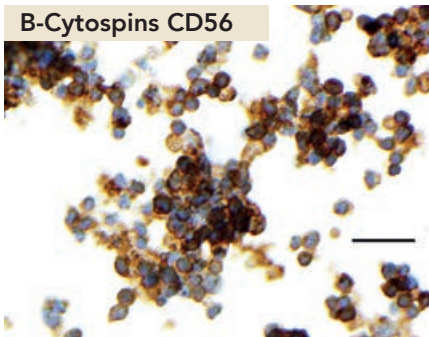
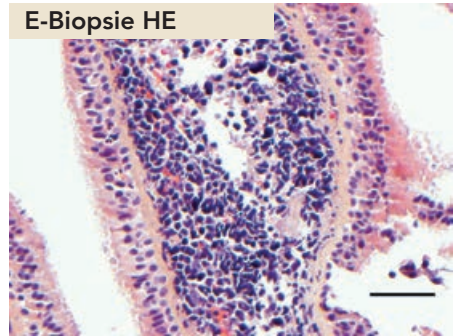
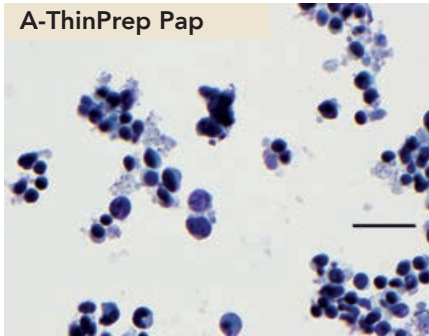


Figure 2 : Comparaison de résultats d'immunocytochimie sur cytopspins (à partir de matériel en milieu liquide Preservcyt, HOLOGIC) (A à D) et sur biopsie correspondante (E à H).

A,E : Papanicolaou sur monocouche, Hémalum-Eosine, barre d'échelle 25 µm (A), 100 µm (E) sur un carcinome à petites cellules pulmonaire. Noter les noyaux hyperchromatiques sur des cellules de taille moyenne au cytoplasme très peu abondant.

B,F : Anti-CD56 (1/40^{ème}), barre d'échelle 50 µm (B) et 100 µm (F). Le marquage membranaire a le même aspect sur les deux préparations;

C,G : Anti-TTF1 (1/50^{ème}), barre d'échelle 50 µm (C), et 100 µm (G). Noter le marquage nucléaire;

D,H : Anti-Synaptophysine (1/10^{ème}), barre d'échelle 25 µm (D), et 50 µm (H). Le marquage cytoplasmique en dot est peu intense sur les deux prélèvements.

CE QU'IL FAUT RETENIR

L'immunocytochimie peut être utilisée en routine avec des anticorps usuels.

Une harmonisation de la fixation des lames est recommandée au sein d'un même laboratoire.

La validation de la méthode peut se faire en comparant les résultats avec ceux obtenus à partir d'un cytobloc du même prélèvement.

Le contrôle de qualité nécessite la présence de témoins positifs au moins dans le même passage de l'automate.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Véronique Lambert, Danièle Chaput et Marie-Claude Flumian pour leur aide technique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SKOOG L, TANI E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*, 2011, **22**,215-29.

2. PINHEIRO C, ROQUE R, ADRIANO A, MENDES P, PRACA M, REIS I, PEREIRA, I. SREBOTNIK KIRBIS I, Andre S. Optimization of immunocytochemistry in cytology: comparison of two protocols for fixation and preservation on cytopspin and smear preparations; *Cytopathology*, 2015, **26**:38-43.
3. KNOEPP SM, PLACIDO J, FIELDS KL, THOMAS D, ROH MH. The Application of Immunocytochemistry to Direct Smears in the Diagnosis of Effusions; *Diagn. Cytopathol.*, 2013,**41**:425-30.
4. UEDA J, IWATA T, ONO M, TAKAHASHI M. Comparison of three cytologic preparation methods and immunocytochemistries to distinguish adenocarcinoma cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. *Diagn. Cytopathol.*, 2006, **34**:6-10.
5. IKEDA K, TATE G, SUZUKI T, MITSUYA T. Comparison of immunocytochemical sensitivity between formalin-fixed and alcohol-fixed specimens reveals the diagnostic value of alcohol-fixed cytocentrifuged preparations in malignant effusion cytology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2011, **136**, 934-42.
6. ZHANG Z, ZHAO L, GUO H, PAN Q, SUN Y. Diagnostic Significance of Immunocytochemistry on Fine Needle Aspiration Biopsies Processed by Thin-Layer Cytology. *Diagn. Cytopathol.* 2012, **40**:1071-6.
7. HAPPERFIELD LC, SAWARD R, GRIMWADE L, BLOXHAM D, ERBER WN. Automated immunostaining of cell smears: an alternative to flow cytometry. *J. Clin. Pathol.*, 2008, **61**, 740-743.
8. CIZKOVA K, FLODROVA P, BARANOVA R, MALOHLAVA J, LACEY M, TAUBER Z. Beneficial Effect of Heat-induced Antigen Retrieval in Immunocytochemical Detection of Intracellular Antigens in Alcohol-fixed Cell Samples. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2018, **8**, in press.
9. KAKIMOTO K, TAKEKOSHI S, MIYAJIMA K, OSAMURA RY. Hypothesis for the mechanism for heat-induced antigen retrieval occurring on fresh frozen sections without formalin-fixation in immunohistochemistry. *J. Mol. Hist.*, 2008, **39**, 389-99.
10. HANSEN T, PEDERSEN H, BRAUNER V, HARIRI J. Control specimens for immunocytochemistry in liquid-based cytology. *Cytopathology*, 2011, **22**, 243-6.
11. ROY S, NANDI A, DAS I, MANDAL PK. Comparative study of cytology and immunocytochemistry with trucut biopsy and immunohistochemistry in diagnosis of localized lung lesions: a prospective study. *J. Cytol.*, 2015, **32**, 90-95.