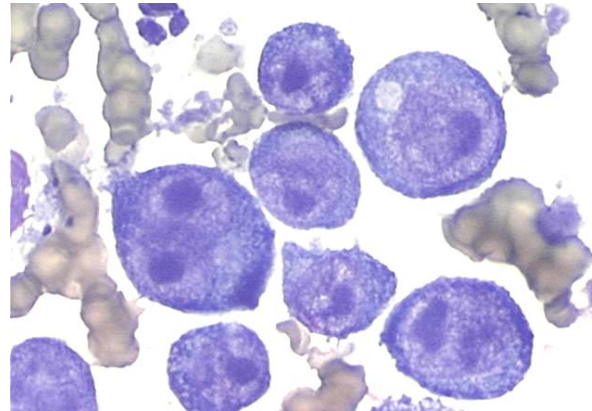
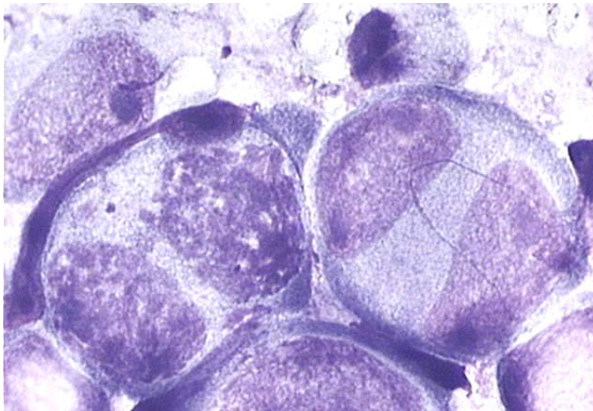


Pourquoi et comment réaliser un examen cytologique?

Dr Nicolas Pouletty

DMV, DES, Dipl. ACVP

(Diplomate of the American College of Veterinary Pathology)



ANALYSES VETERINAIRES

Objectifs

- Connaître les **avantages** et les **limites** de la cytologie
- Savoir **réaliser** une cytologie de qualité
- Se familiariser avec les **applications** de la cytologie comme outil diagnostique
- Comprendre l'approche diagnostique pour différencier un processus **inflammatoire vs non-inflammatoire** et un processus **malin vs bénin**
- Connaître les **principales catégories de lésion** que l'on peut diagnostiquer à la cytologie

Avantages et limites de la cytologie

- Rapide
- Peu coûteux
- Peu invasif
- Risque minimal pour le patient
- Logique diagnostique

MAIS:

- La réponse dépend de la qualité de l'échantillon et du degré d'exfoliation de la lésion
- Pas d'information sur l'architecture du tissu

Types de cytologie

- Deux grandes catégories de prélèvement cytologique:
 - Cytologie de tissus solides
 - Masses cutanées, glandes sous-cutanées, nœuds lymphatiques, œil, oreille, organes internes, etc.
 - Liquides et lavages
 - Épanchements, LCR, liquides synoviaux, LBA, etc...





ANALYSES VETERINAIRES

Prélèvement cytologique de tissus solides

- Préparation de l'animal et du site de prélèvement
- Ponction à l'aiguille fine sans aspiration
- Ponction à l'aiguille fine avec aspiration
- Impression et grattage
- Écouvillon



ANALYSES VETERINAIRES

Préparation de l'animal et du site de prélèvement

- Bonne contention ou sédation de l'animal parfois nécessaire
- Anesthésie générale rarement nécessaire
- Ponction cutanée: site propre, léger nettoyage avec tampon d'alcool généralement suffisant
- Préparation chirurgicale du site de ponction si culture bactériologique ou si pénétration d'une cavité corporelle

1. Ponction à l'aiguille fine sans aspiration

- Technique de choix pour les masses cutanées et de nombreux autres sites et tissus
- Simple ponction sans aspiration avec aiguille démontée
- Une seringue dont le piston est préalablement retiré (2 à 4 ml) est fixée à l'aiguille pour expulser le contenu (avant ou après le prélèvement)

1. Ponction à l'aiguille fine sans aspiration

- Les calibres d'aiguille recommandés sont de 21-G à 23-G, le calibre 22-G étant adéquat dans la majorité des cas
- Seringues nécessaires pour expulser le matériel sur les lames (5 ou 10 ml)
- Rallonge de fluidothérapie pour meilleure manipulation de l'aiguille durant le prélèvement



1. Ponction à l'aiguille fine sans aspiration

- Avantages:
 - Plus facile à exécuter et plus précise qu'un prélèvement avec aspiration
 - Moins de contamination sanguine



1. Ponction à l'aiguille fine sans aspiration

- Lésions de 1,5 cm et + : plusieurs parties de la lésion devraient être ponctionnées
- La réorientation de l'aiguille à l'intérieur de la lésion et la ponction de plusieurs parties d'une même lésion permettent d'obtenir un échantillon plus représentatif
 - Éviter les centres nécrotiques ou zones inflammatoires au sein d'un néoplasme



ANALYSES VETERINAIRES

2. Ponction à l'aiguille fine avec aspiration

- Alternative si ponction à l'aiguille démontée donne un échantillon trop peu cellulaire
- Indiquée pour le prélèvement de tissus qui exfolient peu ou pas (lésion très dure)

2. Ponction à l'aiguille fine avec aspiration

- Même matériel que pour la technique sans aspiration mais une seringue est nécessaire lors de la ponction
- Rallonge de fluidothérapie peut aussi être utilisée



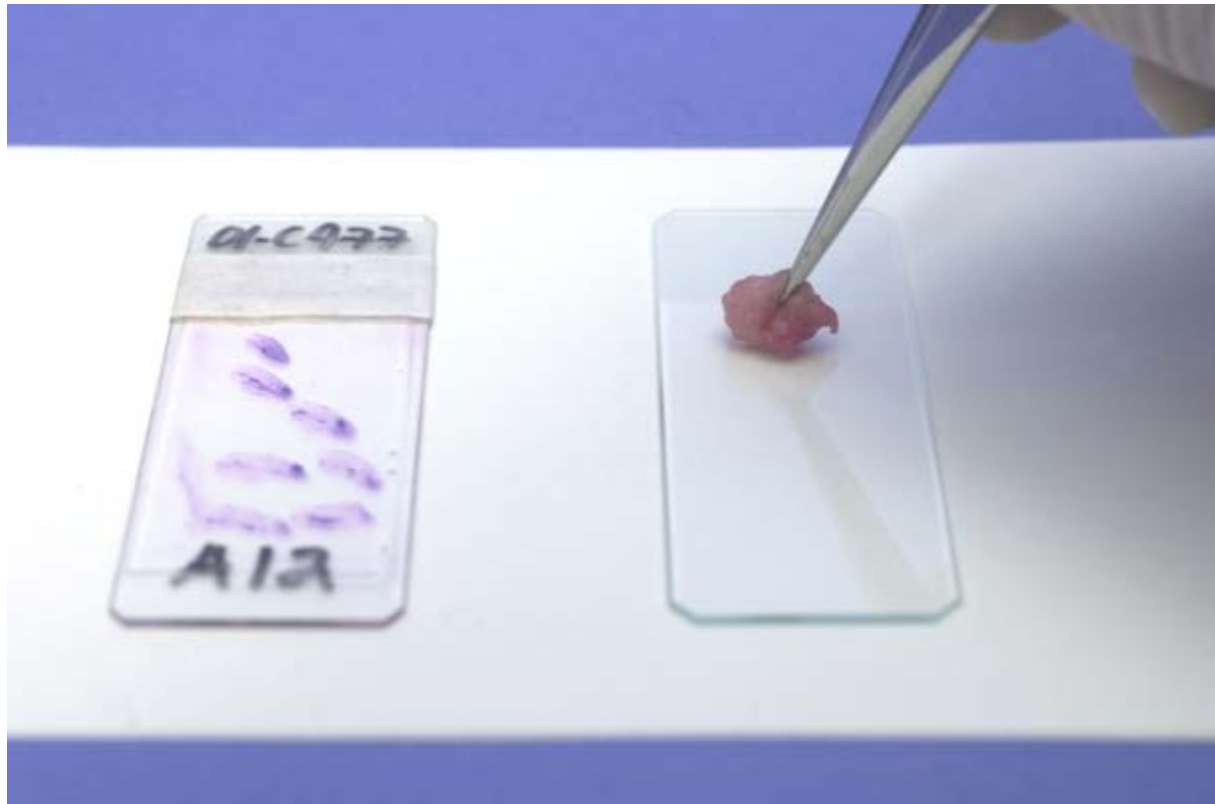
2. Ponction à l'aiguille fine avec aspiration

- Lésion ponctionnée avec une aiguille fixée à une seringue dont le piston est préalablement retiré (2 à 4 ml)
- Dans le tissu, une pression négative est exercée plusieurs fois en retirant le piston au 3/4 du volume de la seringue pour « forcer » les cellules et fragments tissulaires à pénétrer dans l'aiguille
- Changer l'orientation de l'aiguille dans le but d'obtenir un échantillon représentatif de la lésion

3. Impression

- Utilité: Lésions cutanées superficielles ou prélèvements tissulaires obtenus chirurgicalement (biopsies) ou en nécropsie
- Technique:
 - Peau: apposer la lame sur le tissu avec une légère pression pour que les cellules adhèrent par capillarité
 - Biopsie/nécropsie: Une nouvelle coupe dans le tissu est préparée et l'excès de fluide tissulaire est épongé à l'aide de papier absorbant. Le tissu est plusieurs fois appliqué sur la lame que l'on fait sécher

3. Impression



4. Grattage

- Avec une lame de bistouri émoussée, des mouvements de grattage sont effectués de façon unidirectionnelle et perpendiculairement à la surface de la peau ou de la surface de coupe d'une biopsie
- Le matériel récolté est ensuite déposé sur une lame puis étalé et séché

Impression et grattage

- Bonne technique pour rechercher des agents infectieux ou une inflammation de surface
- Peu sensible pour diagnostiquer les néoplasmes car les cellules exfolient peu ou pas; échantillonnage en surface seulement

5. Écouvillon

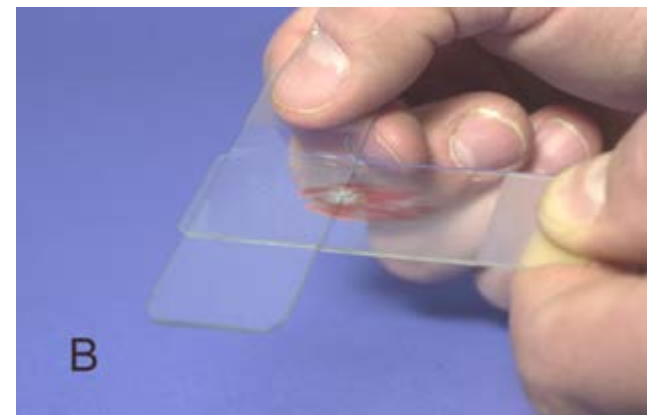
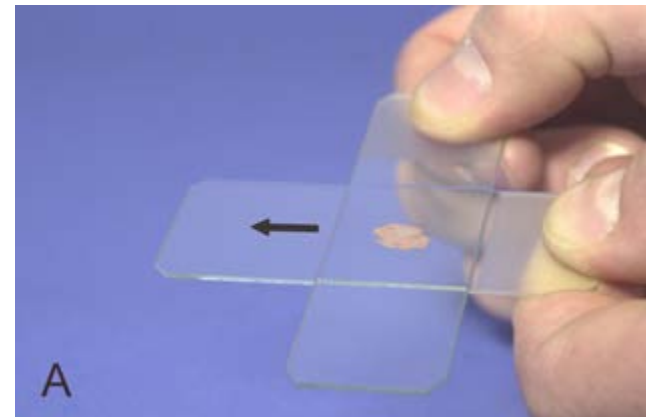
- Lésions fistuleuses, l'oreille, les passages nasaux, les lésions de la cavité orale et le tractus génital externe (vagin, prépuce)
- Le matériel est roulé sur une lame
- Utile pour rechercher des agents infectieux ou déterminer le cycle œstral de la chienne
- Comme pour les impressions et grattage, généralement peu utile pour le diagnostic de néoplasmes

Préparation des frottis

- Deuxième point critique dans la préparation de l'échantillon
- Étalement rapide pour éviter la coagulation et l'assèchement de l'échantillon
- But: obtenir une couche monocellulaire de cellules intactes

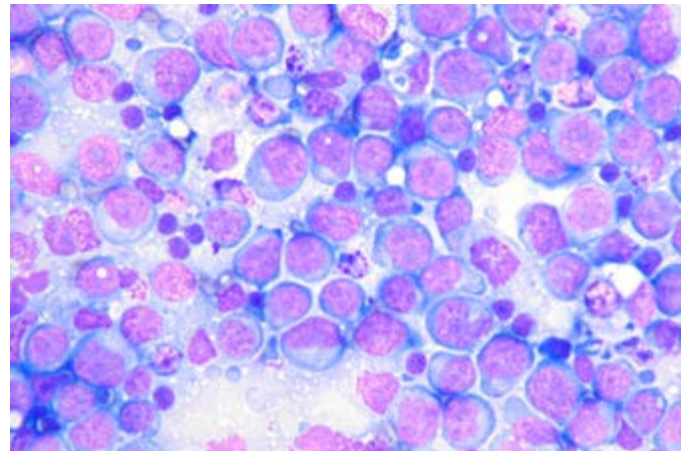
Préparation des frottis

- Le contenu de l'aiguille est éjecté sur une lame de verre propre sur laquelle une deuxième lame est déposée **délicatement** et perpendiculairement à la première
- Le spécimen est étalé en faisant glisser les deux lames l'une par rapport à l'autre **sans pression**



Préparation des frottis

- Certaines cellules sont particulièrement fragiles et s'éclatent très facilement au moment de l'étalement
- Cellules éclatées: une cause fréquente d'échantillons non diagnostiques



Préparation des frottis

- Le séchage de la lame contenant le matériel étalé doit se faire rapidement en agitant la lame ou en employant un sèche cheveux (puissance faible et sans chaleur)
- Jamais de fixation à la flamme ou au formol

Préparation des frottis

- Coloration de type Romanowski comme le **Wright-Giemsa** ou de type rapide comme le **Diff-Quik** utilisés en cytologie de routine
- Colorations spéciales disponibles en laboratoire mais rarement employées de routine en cytologie: Nouveau Bleu de Méthylène, Gram, Ziehl-Neelsen, bleu de Prusse, etc.

Préparation des frottis



Coloration Diff-Quik

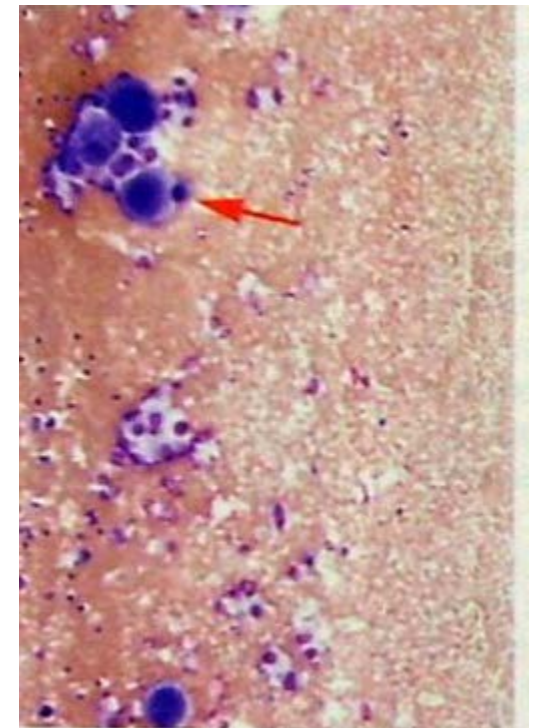
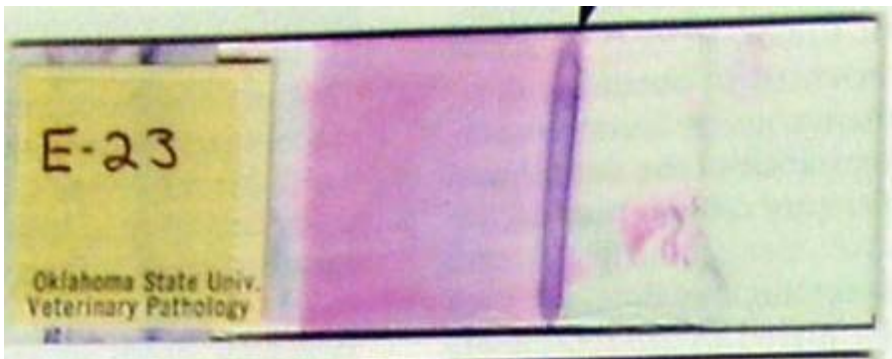
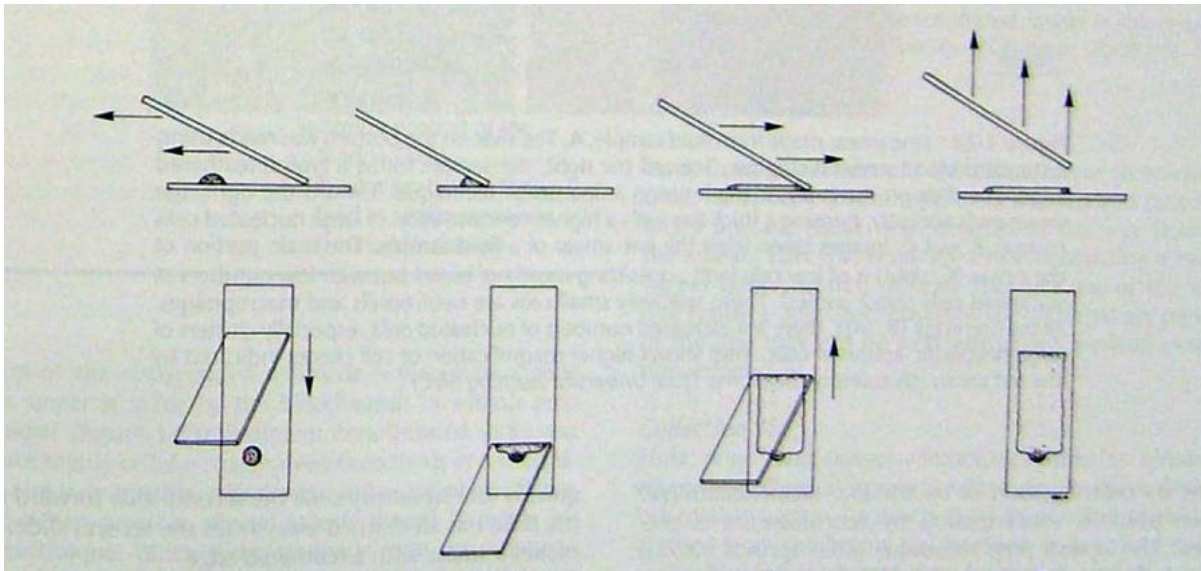
Préparation des liquides biologiques

- Envoi de liquide pour analyse cytologique : rapide (ex. Chronopost)
- Toujours mettre le fluide dans l'EDTA
 - Prévient la coagulation
 - Permet de réaliser un comptage cellulaire/ mesure du taux protéique
- Un tube sec peut être conservé si une culture est envisagée (l'EDTA est bactériostatique)

Préparation des liquides biologiques

- Alternative à l'envoi de liquide: envoi de lames préparées à la clinique/cabinet
 - Permet de préserver la morphologie cellulaire
 - Pour les liquides riches en cellules (ex. arthrite, péritonite): étaler le liquide comme un frottis sanguin ou « avec ligne d'arrêt »
 - Pour les liquides pauvres en cellules (ex. lavages broncho-alvéolaires): étendre le culot de centrifugation sur une lame (comme un frottis sanguin avec ou sans « ligne d'arrêt »)

Préparation des liquides biologiques



Cellularité des échantillons cytologiques

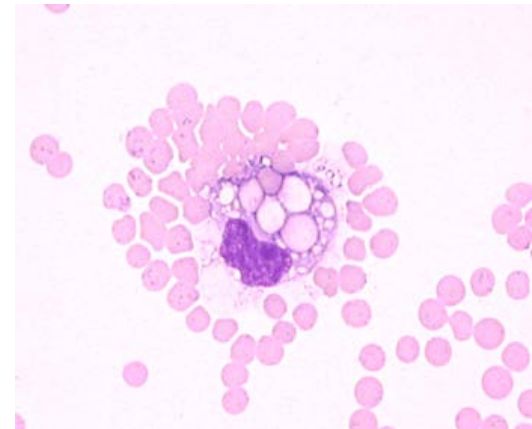
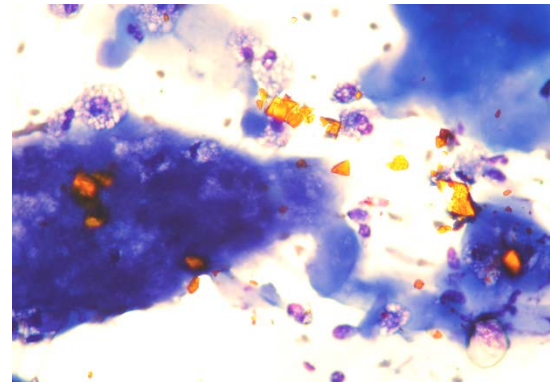
- La cellularité de l'échantillon est la première chose à évaluer avant de poser un diagnostic ou d'envoyer les lames à un pathologiste clinique
- Certains processus exfolient peu (ex. sarcome des tissus mous, ostéosarcome) et donneront des lames peu cellulaires
- On décrit la cellularité comme étant faible, modérée ou élevée

Sang: contamination ou hémorragie?

- Contamination sanguine toujours présente mais il faut évaluer s'il y a aussi hémorragie vraie
- Contamination:
 - Amas de plaquettes
 - Pas d'érythrophagie
 - Pas de pigment d'hémosidérine ou d'hématoïdine

Sang: contamination ou hémorragie?

- Hémorragie vraie:
 - Érythrophagie et/ou
 - Pigments d'hemosidérine et/ou
 - Pigments d'hématoïdine



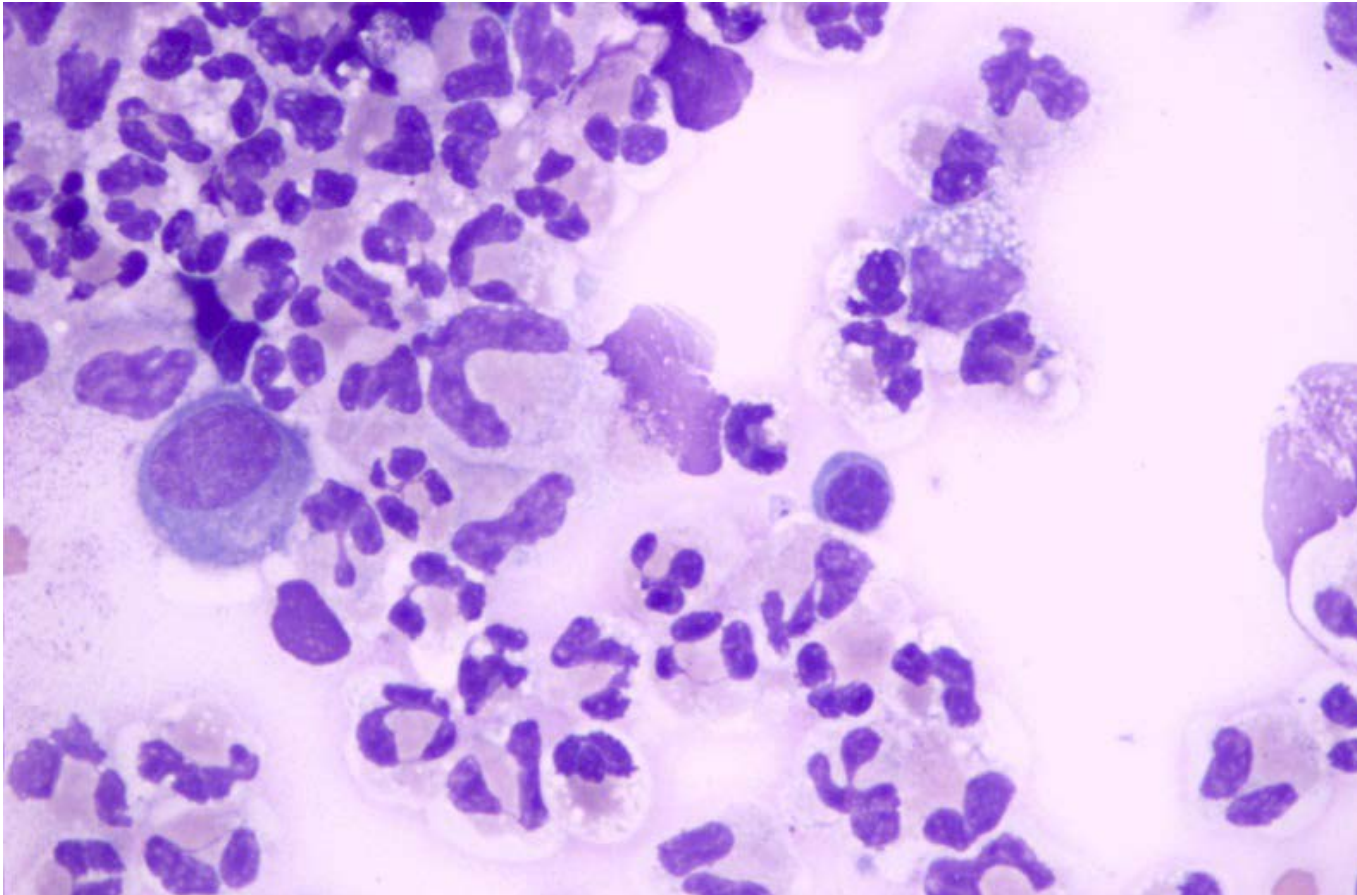
Caractérisation de la lésion

- Principale Question à se poser:
 - Inflammatoire ou non-inflammatoire?
 - Si toutes les cellules sont des leucocytes, la lésion est de type **inflammatoire**
 - Si toutes les cellules ne sont pas des leucocytes, la lésion est **non-inflammatoire**
 - Si les deux types sont présents, la lésion est **mixte**

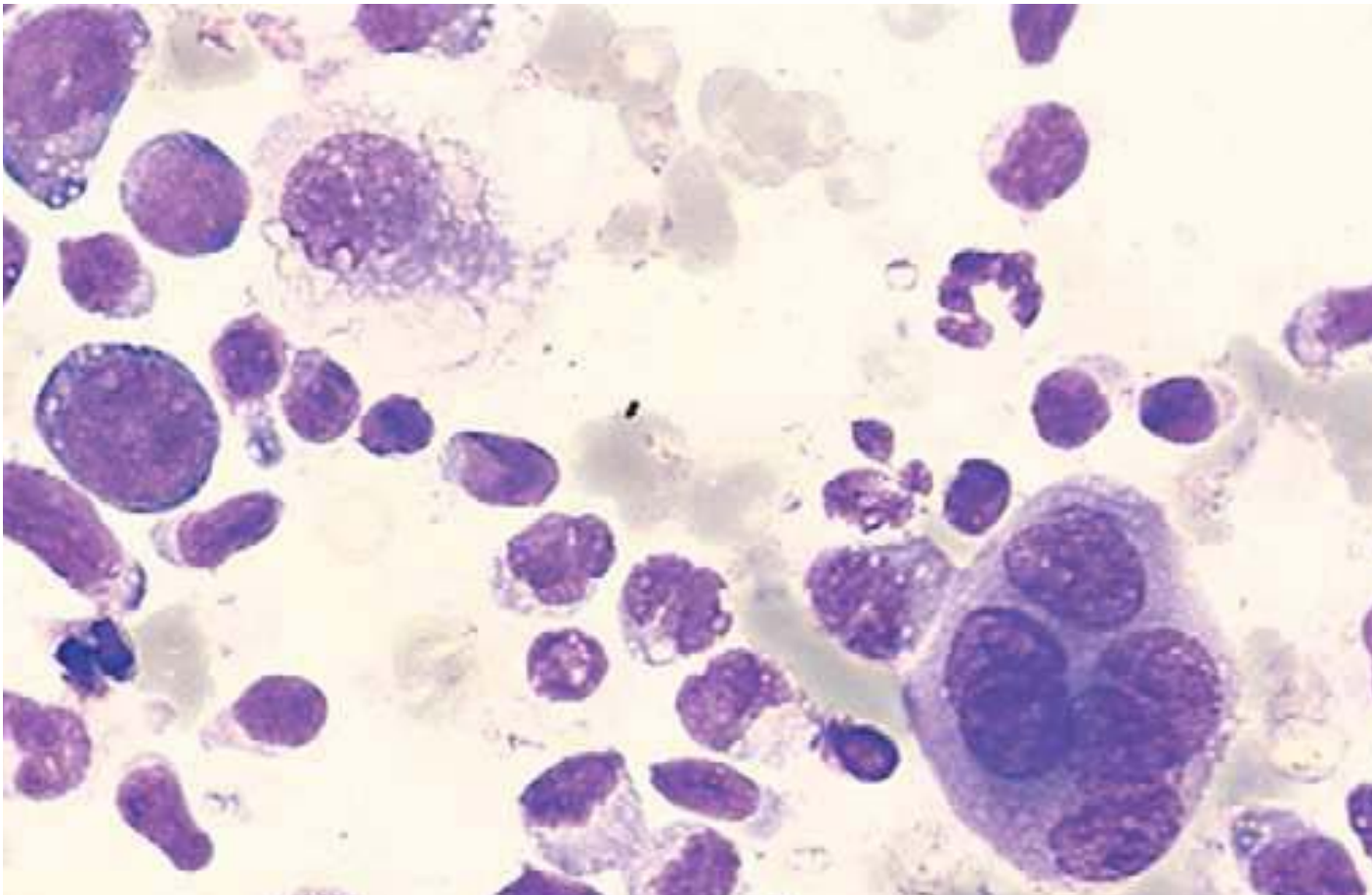
Caractérisation des lésions inflammatoires

- Caractérisation selon le type cellulaire:
 - **Suppuratif** : > 80% neutrophiles
 - **Pyogranulomateux**: 50-79% neutrophiles, le reste étant des macrophages ou des cellules géantes et d'autres cellules (lymphocytes, plasmocytes)
 - **Granulomateux**: >50% macrophages, cellules géantes (multinucléées), lymphocytes, plasmocytes et peu de neutrophiles
 - **Éosinophilique**: >10-30% éosinophiles

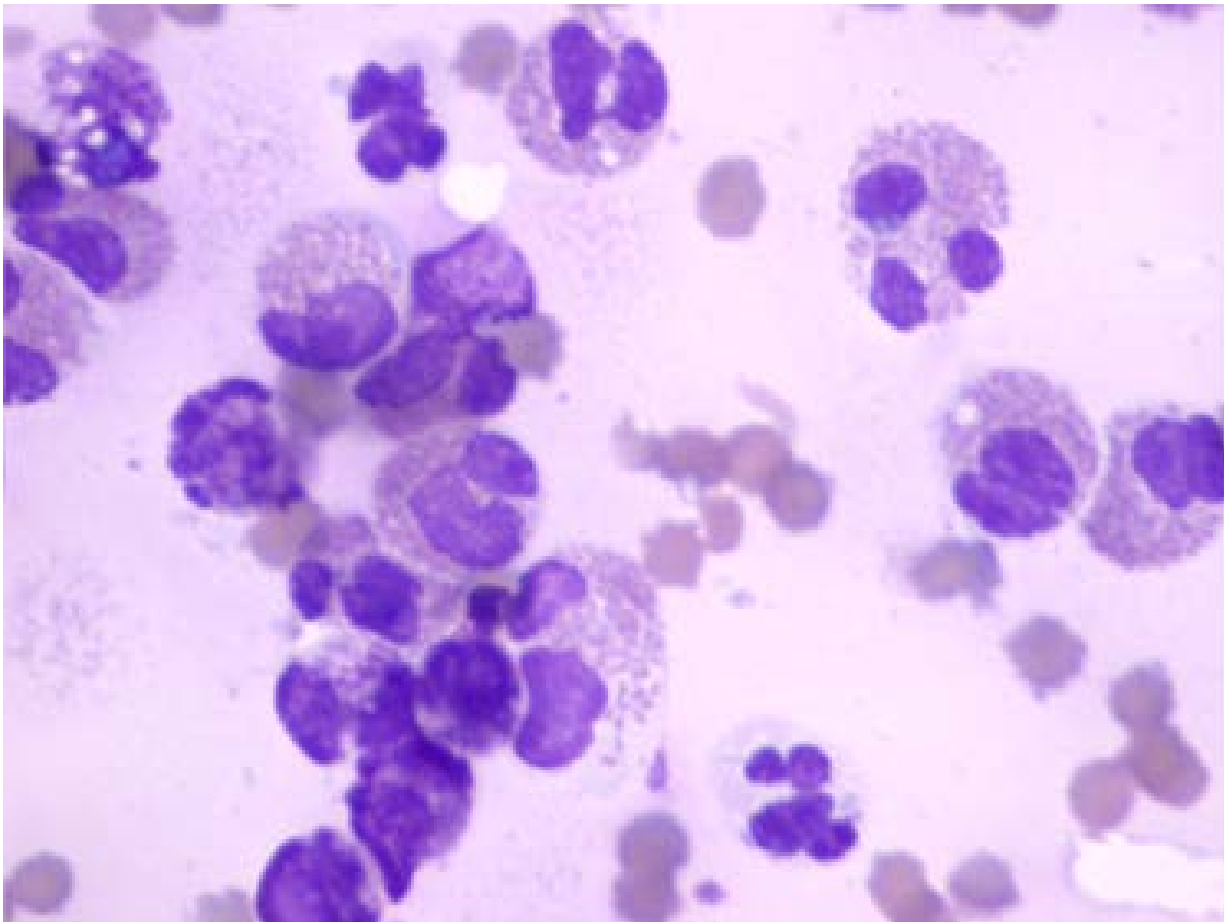
Caractérisation des lésions inflammatoires



Caractérisation des lésions inflammatoires



Caractérisation des lésions inflammatoires





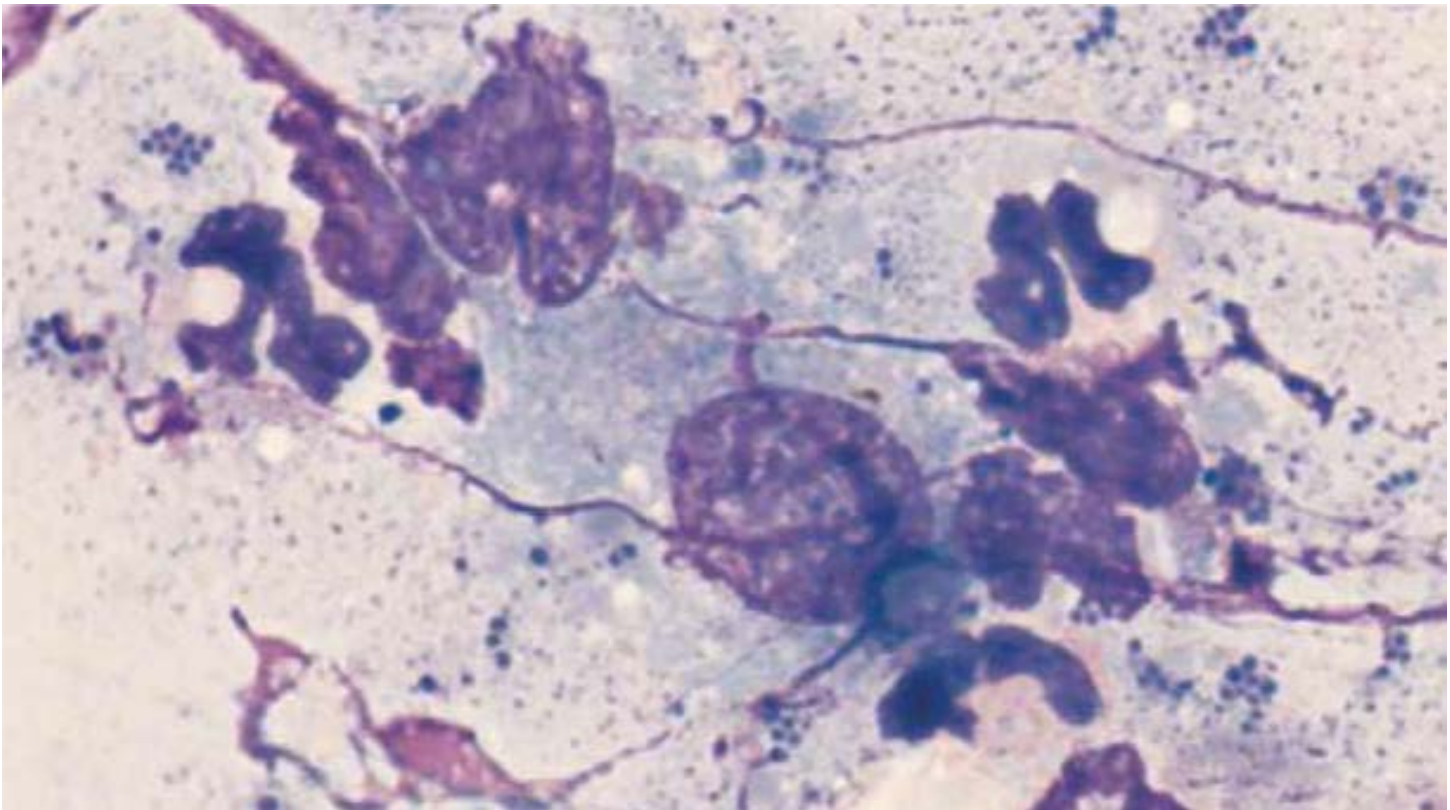
ANALYSES VETERINAIRES

Lésion inflammatoire: microorganismes ?

- Dans une lésion inflammatoire, l'étape de microscopie suivante est la recherche de microorganismes
 - Bactéries
 - Fongi
 - Levures
 - Hyphes
 - Spores
 - Protozoaires

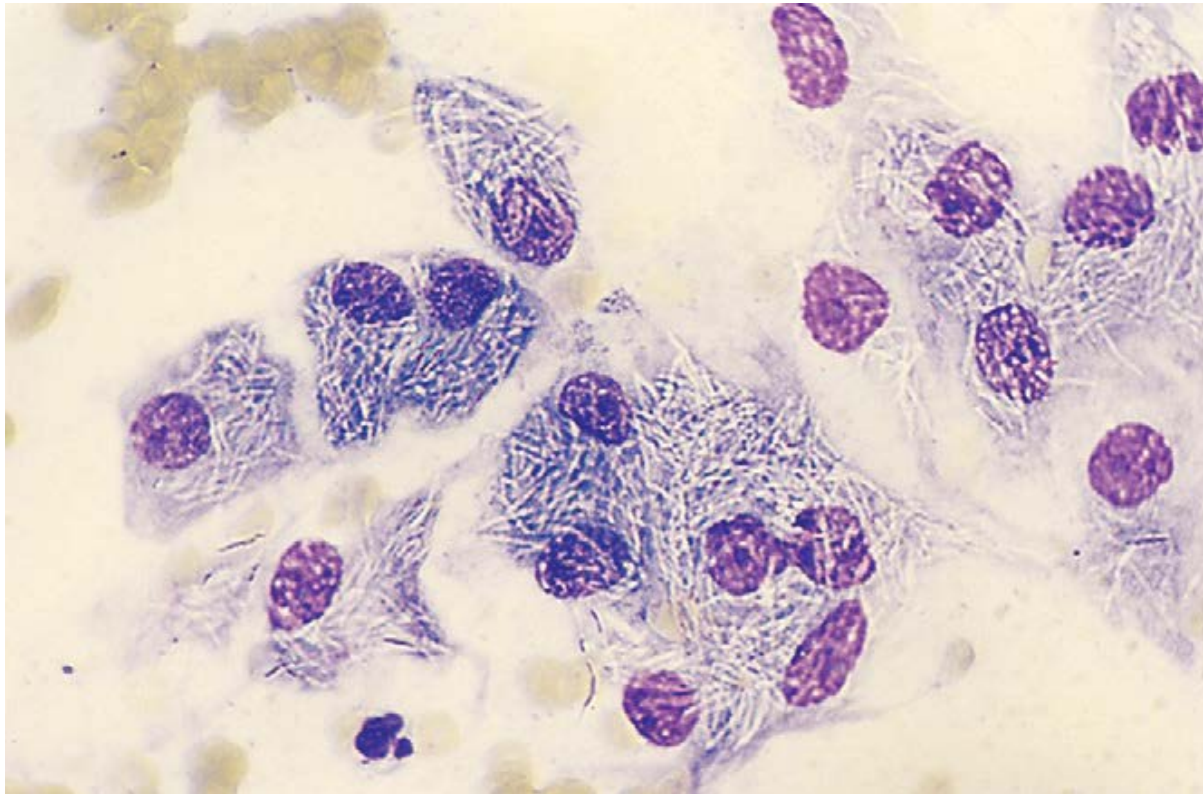
Lésion inflammatoire: microorganismes ?

Coques



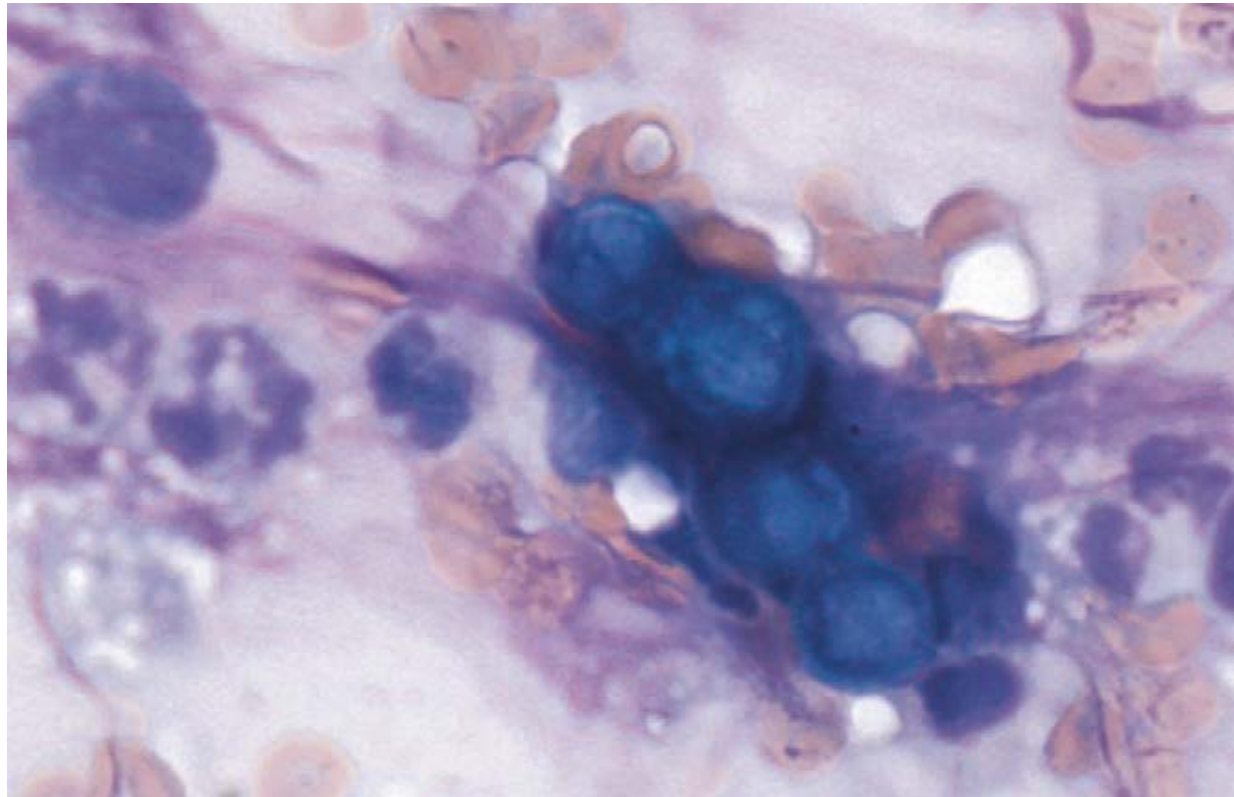
Lésion inflammatoire: microorganismes ?

Mycobactéries

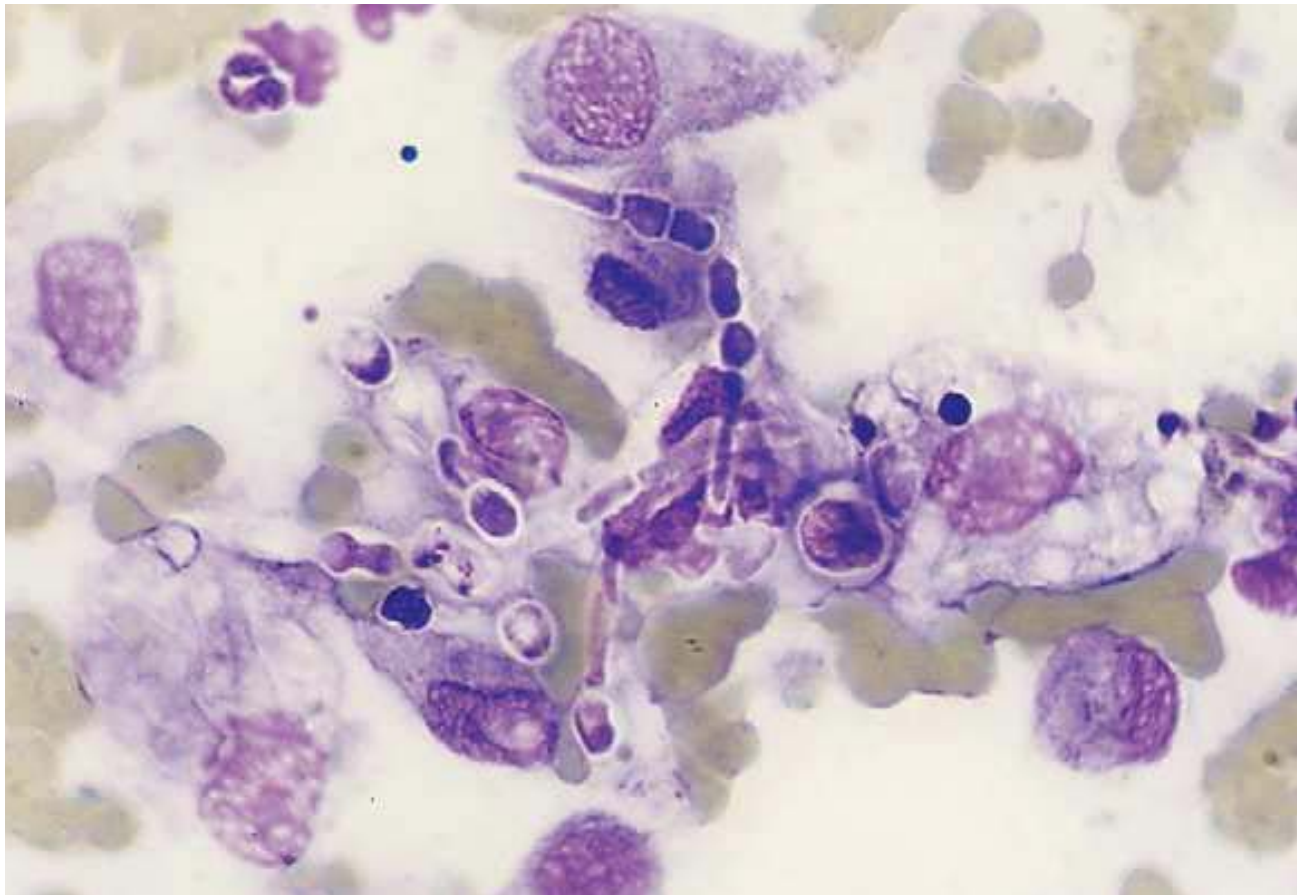


Lésion inflammatoire: microorganismes ?

Blastomycose



Lésion inflammatoire: microorganismes ?

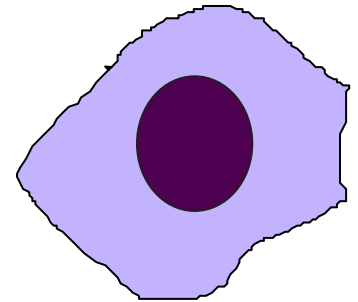


Caractérisation des lésions non-inflammatoires

- Si une lésion est jugée non-inflammatoire, il faut catégoriser les cellules selon un des 3 types cellulaires:

1. Les cellules épithéliales:

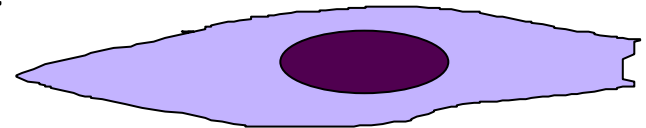
- apparence: cuboïde à polygonale, en amas cohésifs
- tissus possibles: épithélium de la peau, des organes glandulaires (foie, prostate, etc.), des poumons, etc.



Caractérisation des lésions non-inflammatoires

2. Les cellules mésenchymateuses:

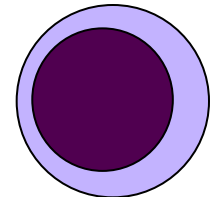
- apparence: allongée, étoilée, triangulaire, ovale; souvent une “queue” de cytoplasme d’un côté ou l’autre de la cellule; isolées ou à l’occasion en agrégats lâches (pas de cohésion).
- Tissus possibles: Tous les tissus conjonctifs (ostéoblastes: ostéome ou ostéosarcome, fibroblastes: fibrome ou fibrosarcome, etc...)



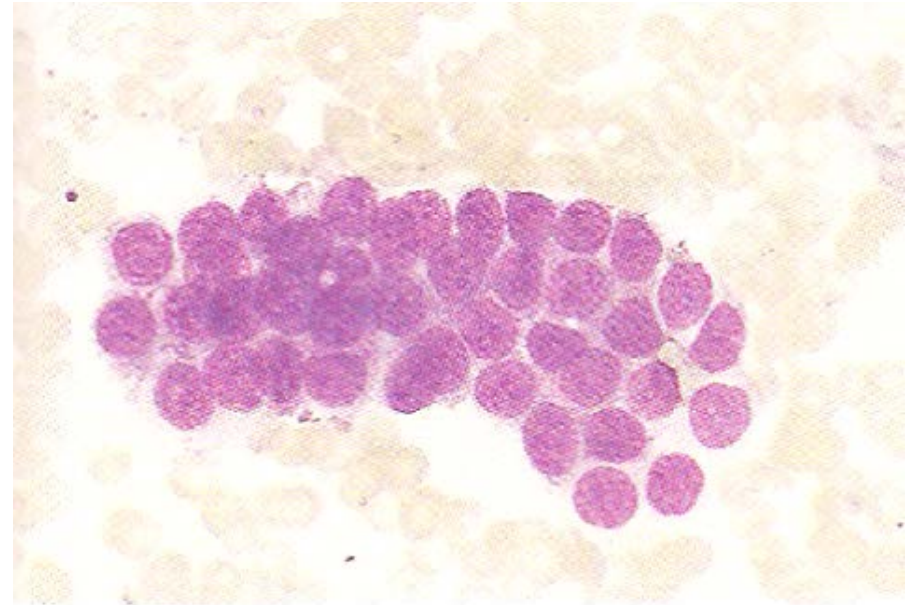
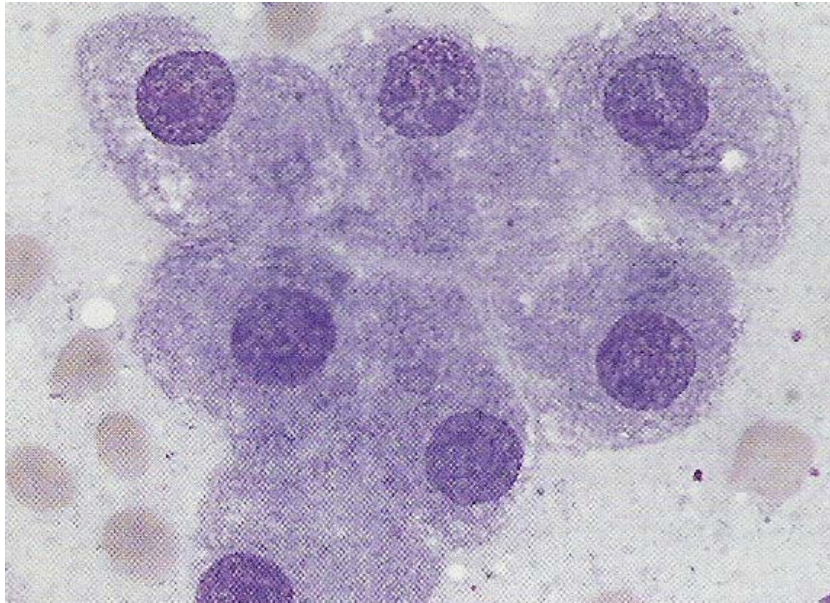
Caractérisation des lésions non-inflammatoires

3 . Les cellules rondes:

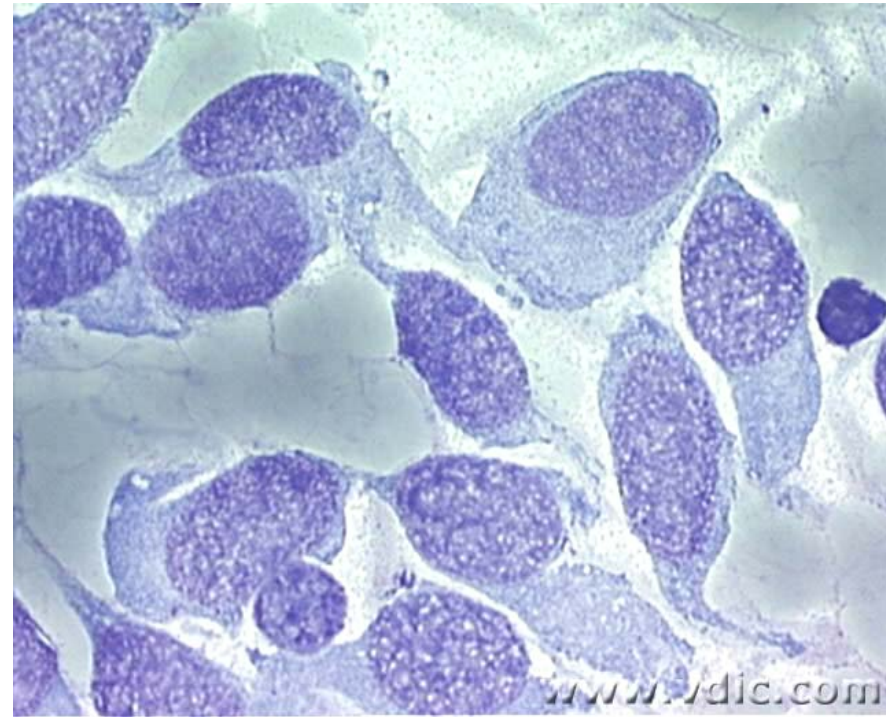
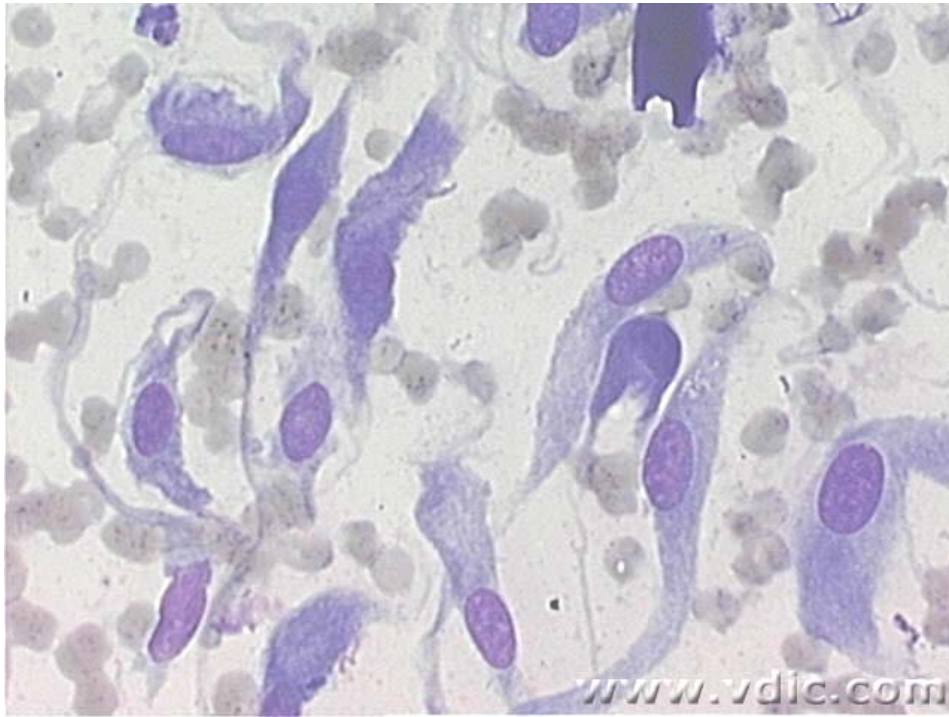
- apparence: ronde, isolées
- tissus possibles:
 - 1) Mastocytes: mastocytome
 - 2) Histiocytes : histiocytome bénin, histiocytose maligne/sarcome histiocytaire
 - 3) Lymphocytes/blastes : lymphome
 - 4) Plasmocytes : plasmocytome extramédullaire, myélome multiple
 - 5) Mélanocytes +/-



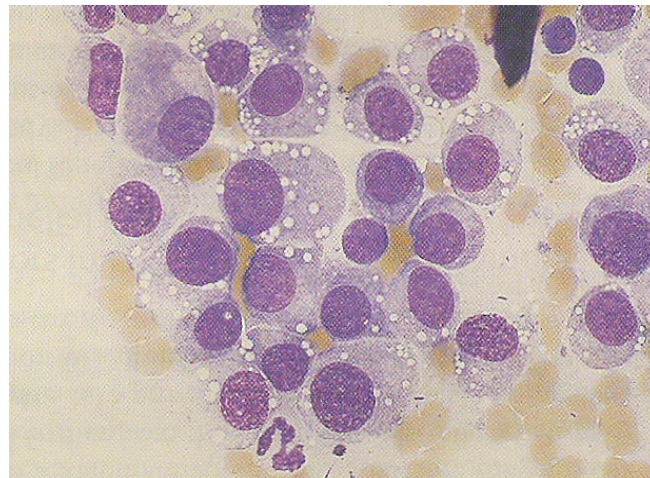
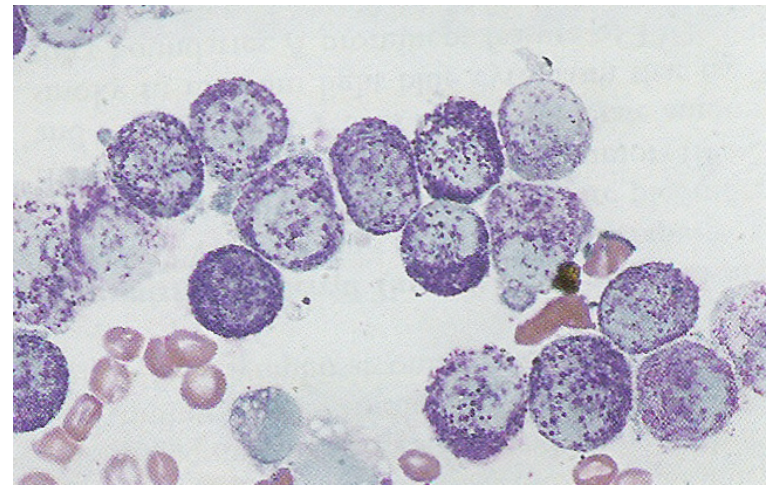
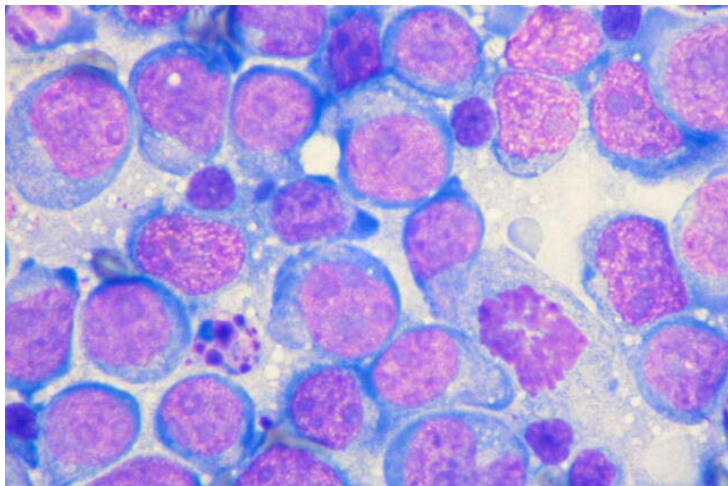
Tumeurs épithéliales



Tumeurs mésoenchymateuses



Tumeurs des cellules rondes





ANALYSES VETERINAIRES

Bénin vs malin: les critères de malignité?

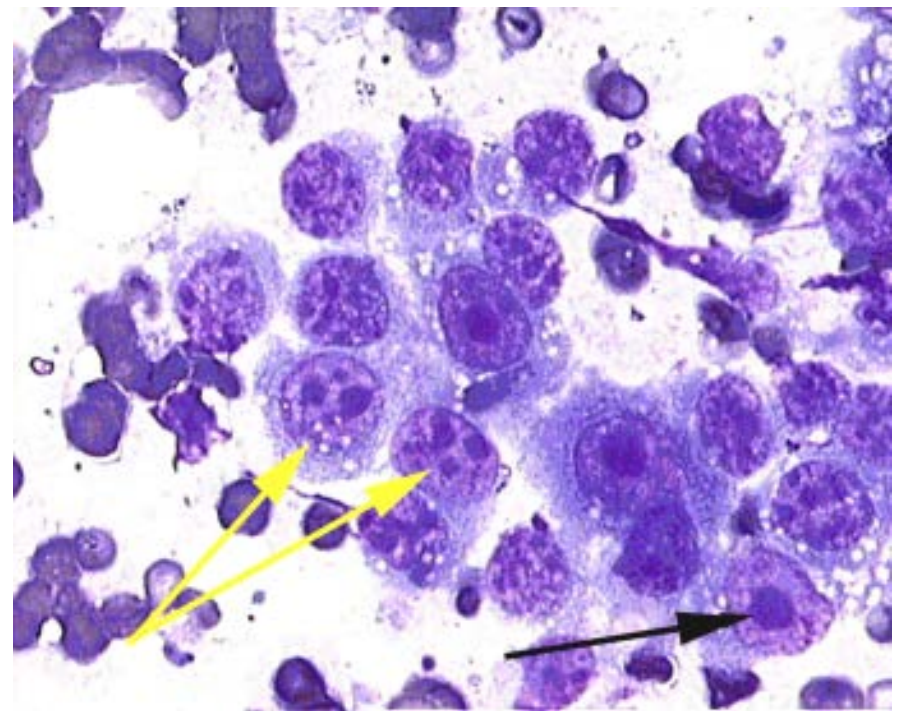
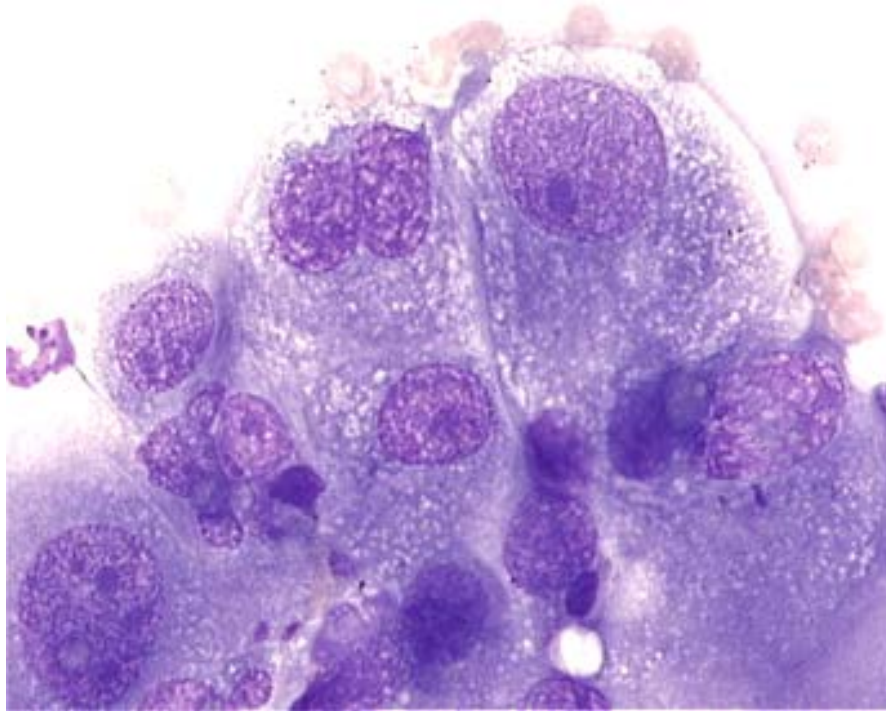
- **Critères nucléaires:**

- Anisocaryose
- Ratio N/C élevé
- Mitoses anormales
- Chromatine agglomérée
- Empilement nucléaire
- Multinucléation
- Variation de taille, de forme et du nombre des nucléoles

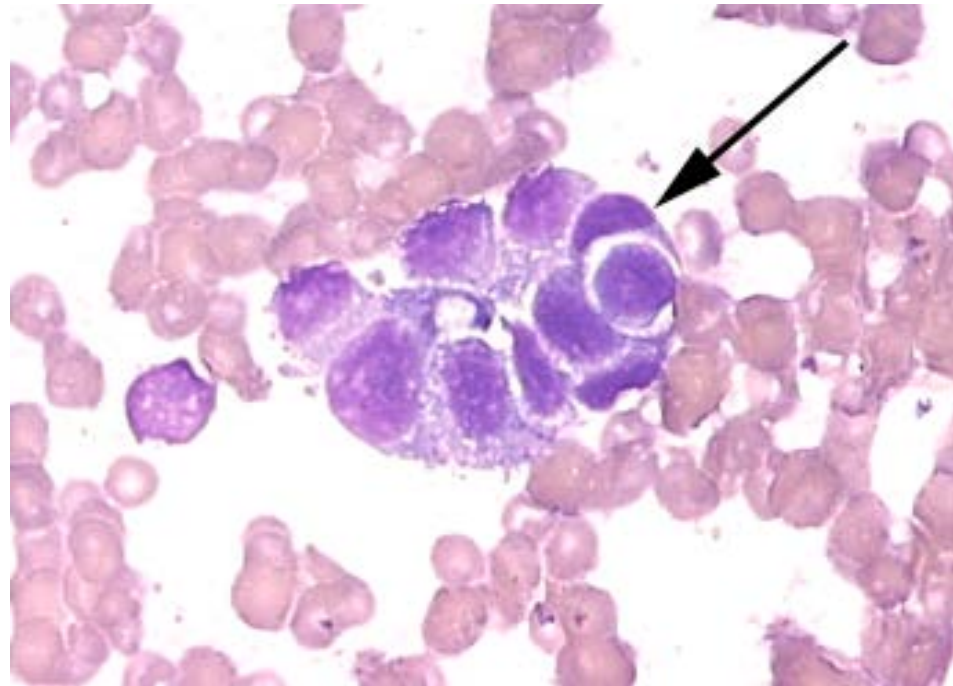
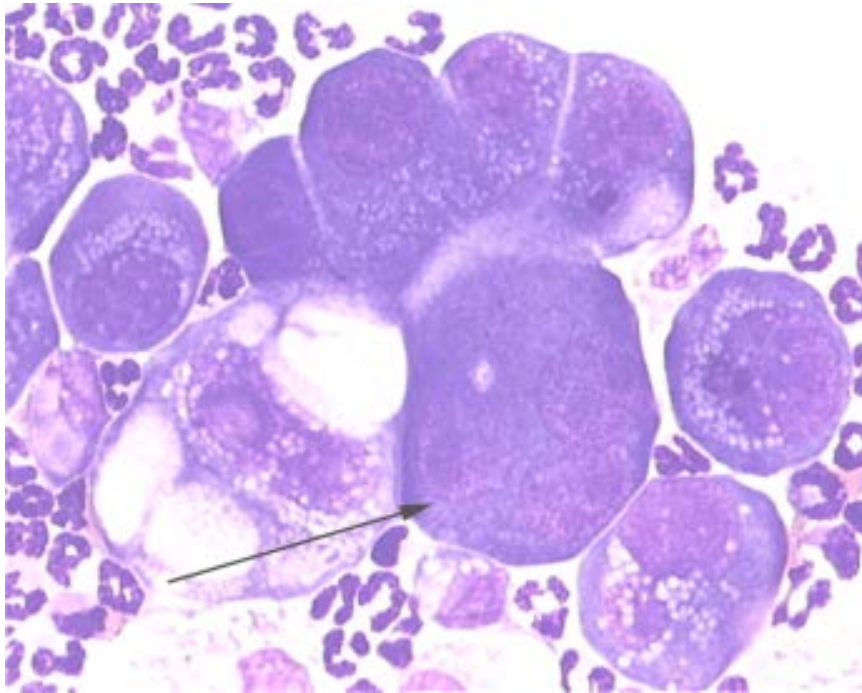
- **Critères cytoplasmiques:**

- Anisocytose
- Basophilie
- Pléomorphisme
- Entassement cellulaire

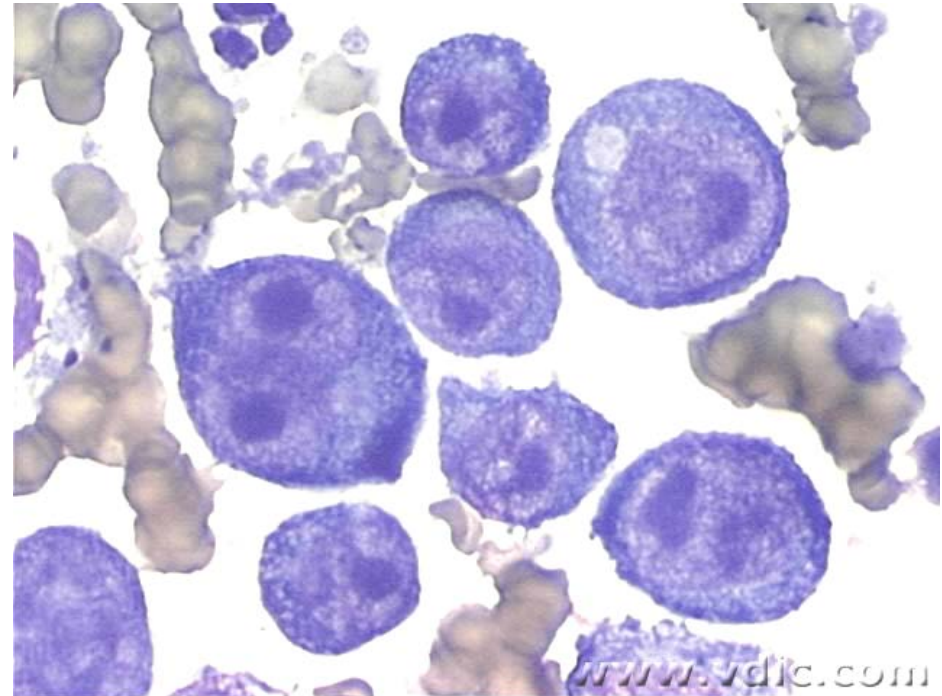
Bénin vs malin: les critères de malignité?



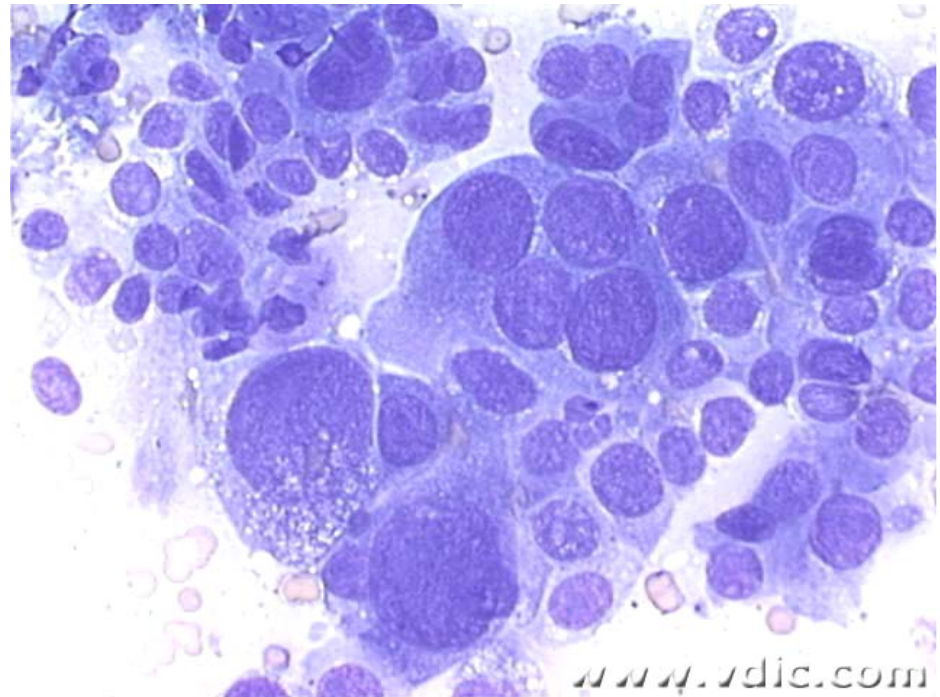
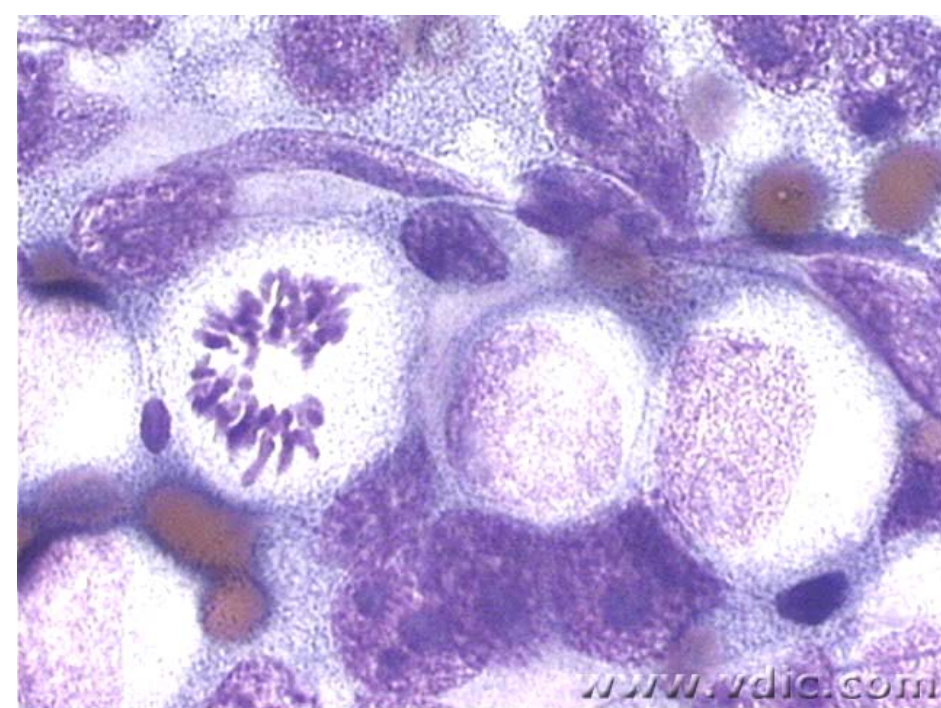
Bénin vs malin: les critères de malignité?



Bénin vs malin: les critères de malignité?



Bénin vs malin: les critères de malignité?



Les critères de malignité: les exceptions!

- Il existe des lésions bénignes qui démontrent beaucoup de critères de malignité!
 - Exemple: certains tissus de granulation (fibroplasie) associés à une inflammation
- Il existe des lésions malignes qui démontrent peu ou pas de critères de malignité
 - Exemple: Tumeur neuroendocrine
- Dans ces cas, l'opinion d'un pathologiste clinique est recommandée.

Examen cytologique des liquides d'épanchement

- Liquide thoraciques, abdominaux
 - Détermination du comptage cellulaire
 - Détermination du taux de protéines (réfractomètre)
 - Composition cellulaire (différentiel) et évaluation cytologique des cellules
- Autres liquides
 - Liquide synovial, LCR, LBA, LT etc.

Épanchement thoracique ou abdominal

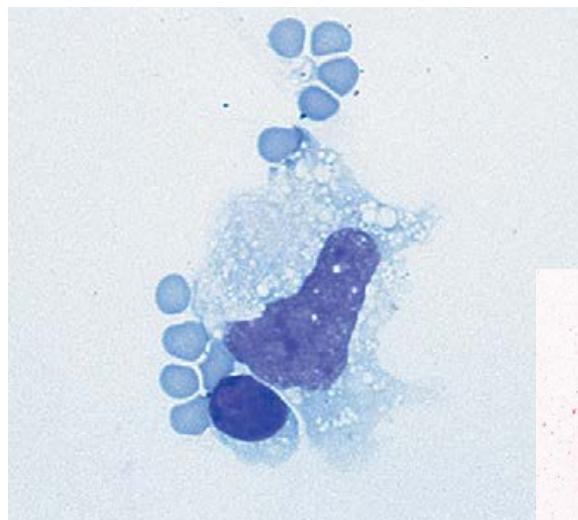
	Comptage ϕ	Protéines g/L
Transsudat simple	$< 1.5 \times 10^9/L$	< 25
Transsudat modifié	$1.0 \text{ à } 7.0 \times 10^9/L$	$25 \text{ à } 75$
Exsudat	$> 7.0 \times 10^9/L$	> 30

Épanchement thoracique ou abdominal

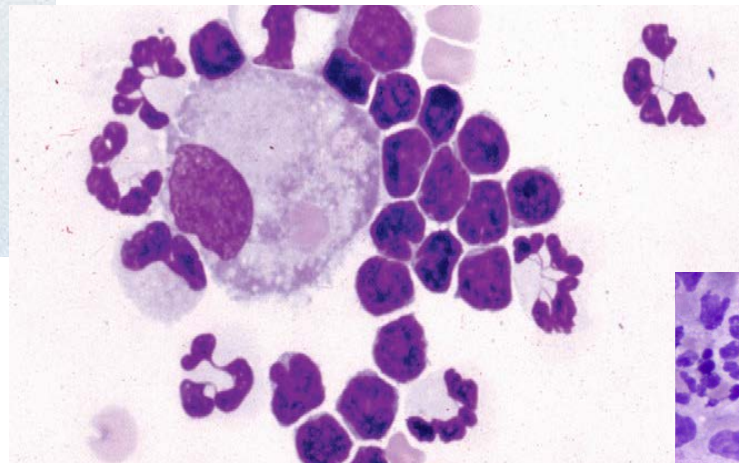
- Transsudat:
 - Hypoalbuminémie, début IC, insuffisance hépatique, etc.
- Transsudat modifié:
 - Transsudat présent depuis une longue période, vasculite (PIF), IC, compression vasculaire par un néoplasme, torsion d'organe, etc.
- Exsudat:
 - Inflammation, néoplasme, etc.

Épanchement : cause?

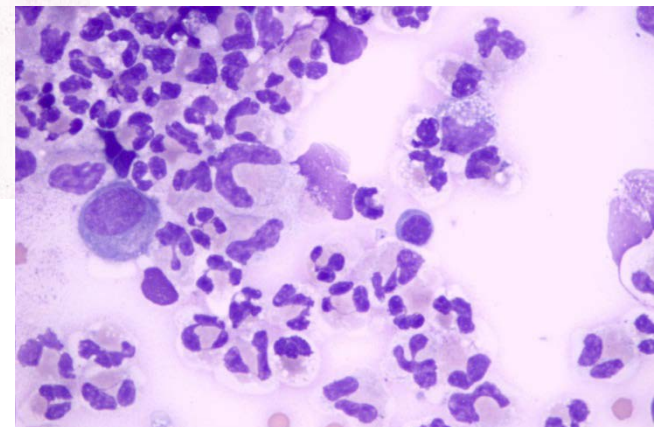
Transsudat



Transsudat modifié

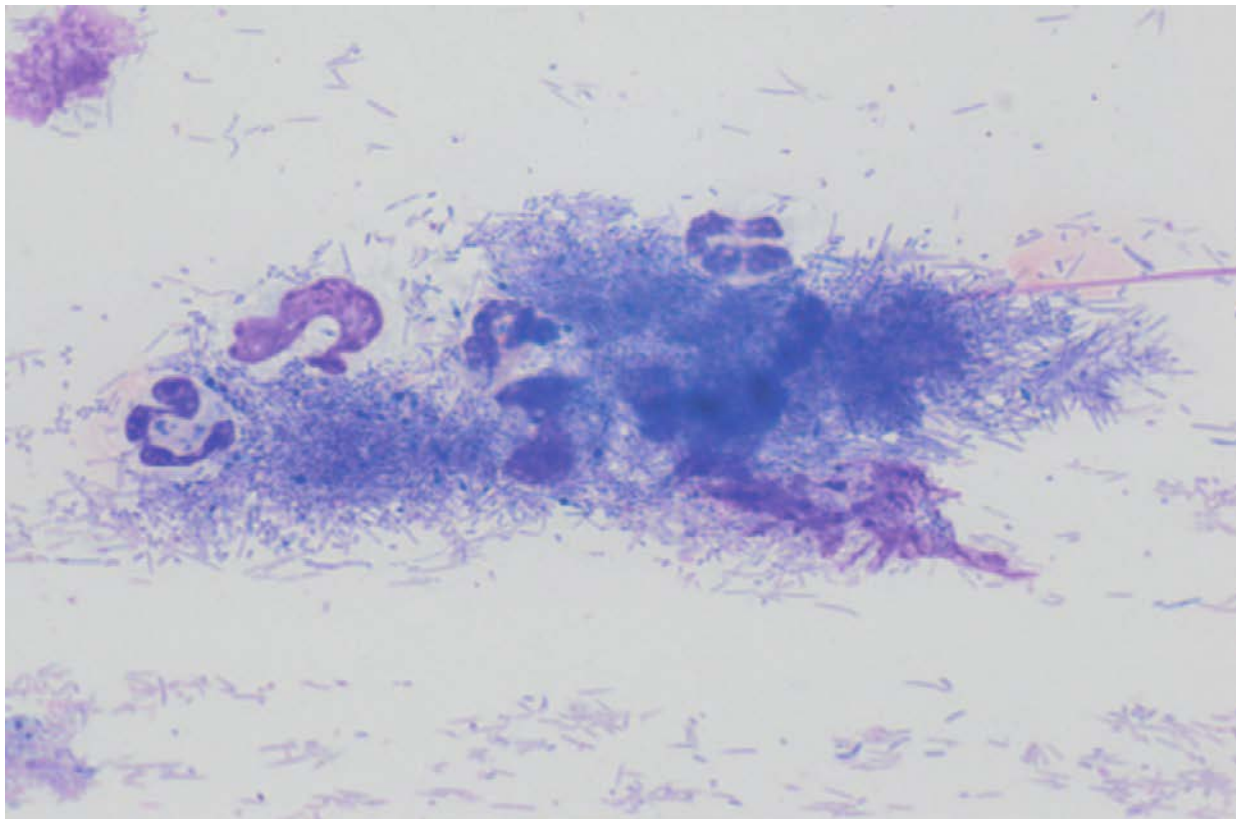


Exsudat



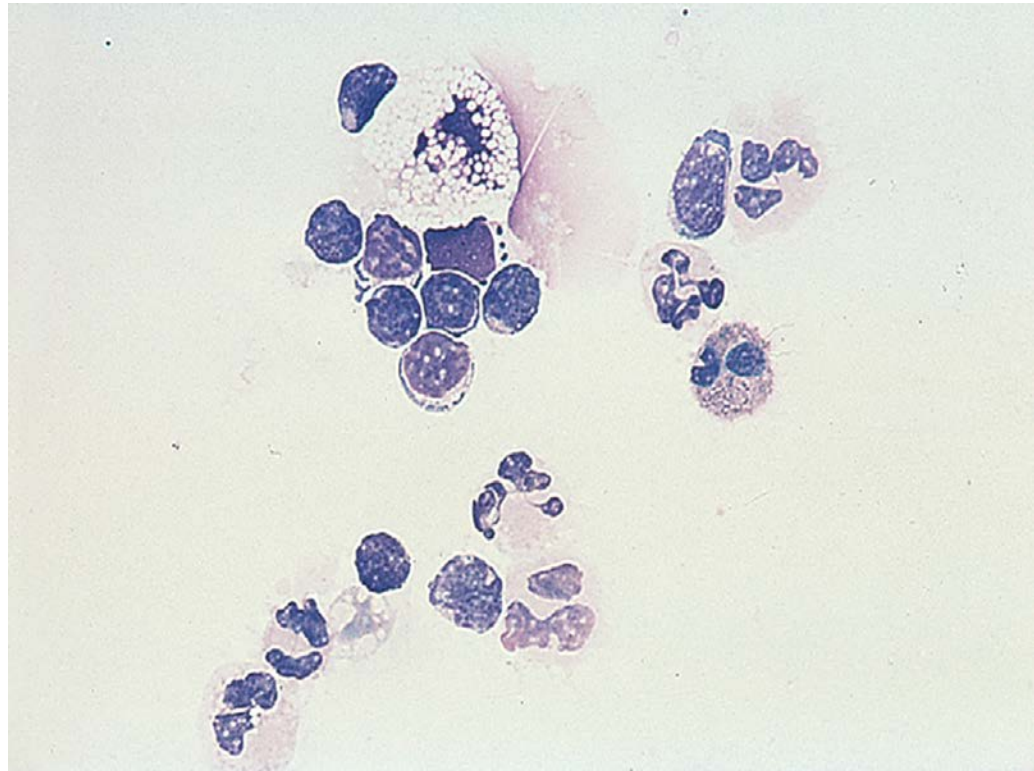
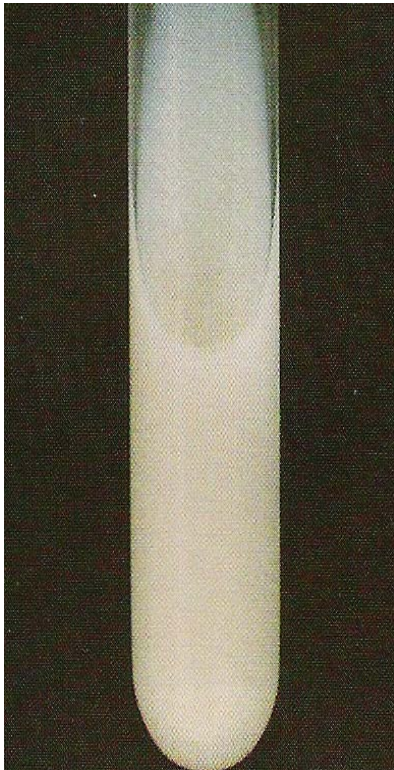
Épanchement : cause?

Actinomycose



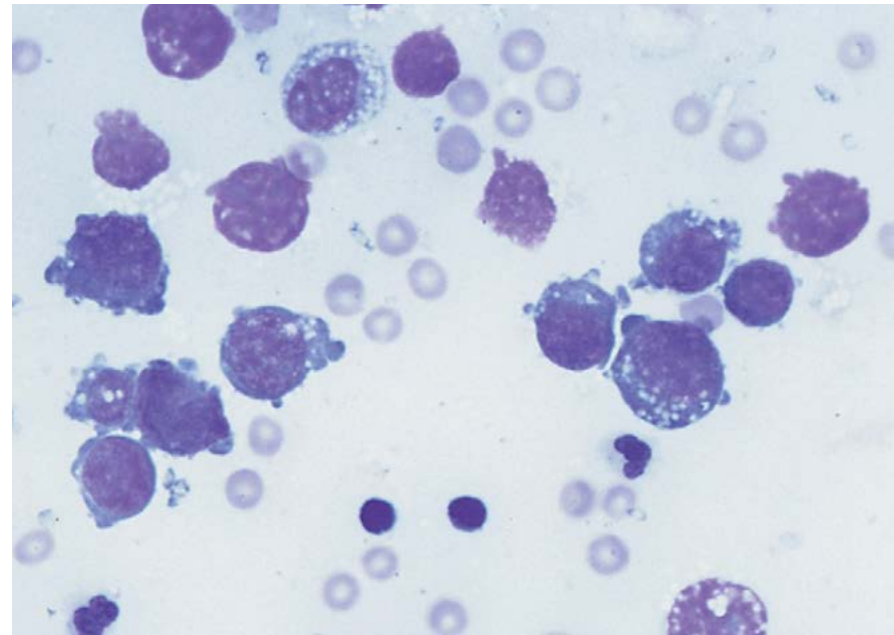
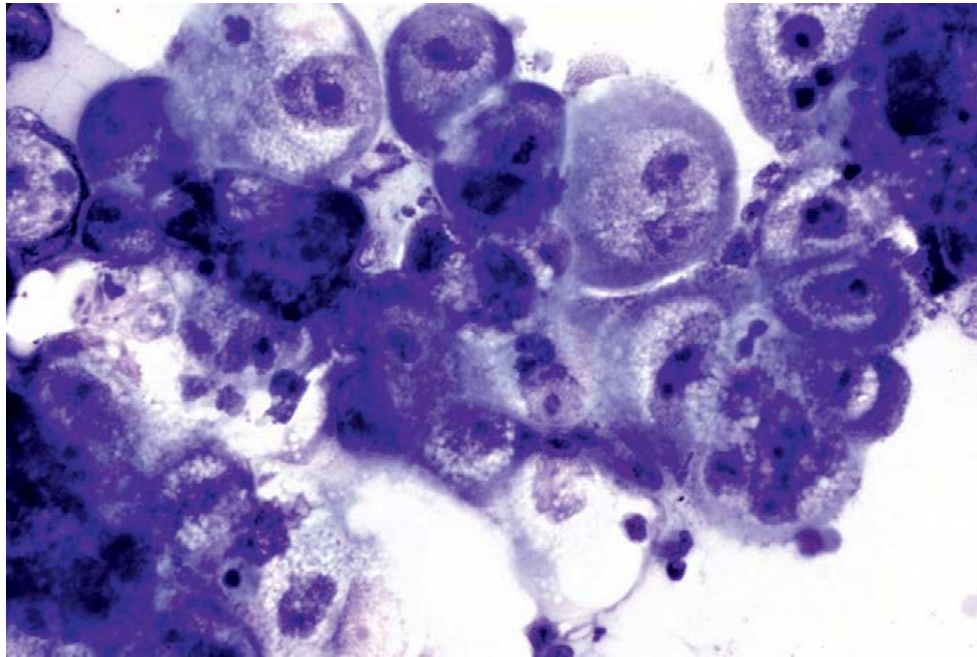
Épanchement : cause?

Chylothorax



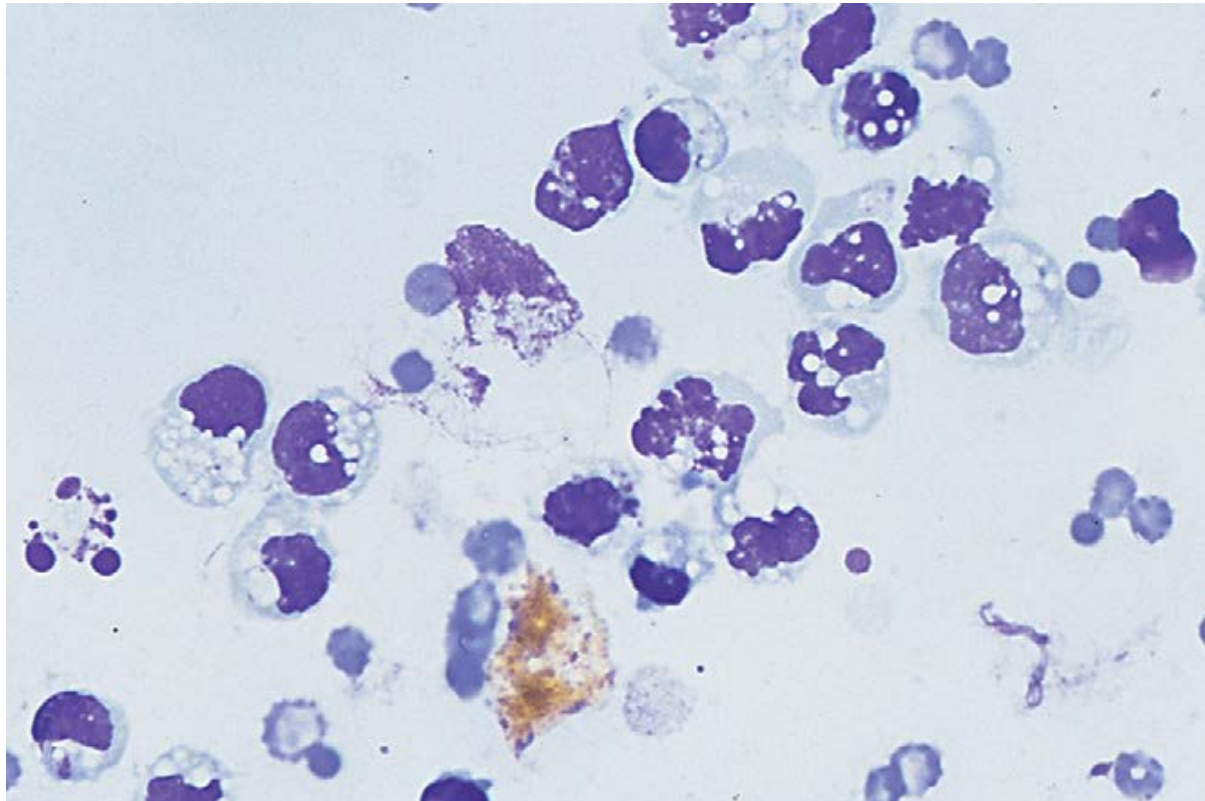
Épanchement : cause?

Épanchement néoplasique



Épanchement : cause?

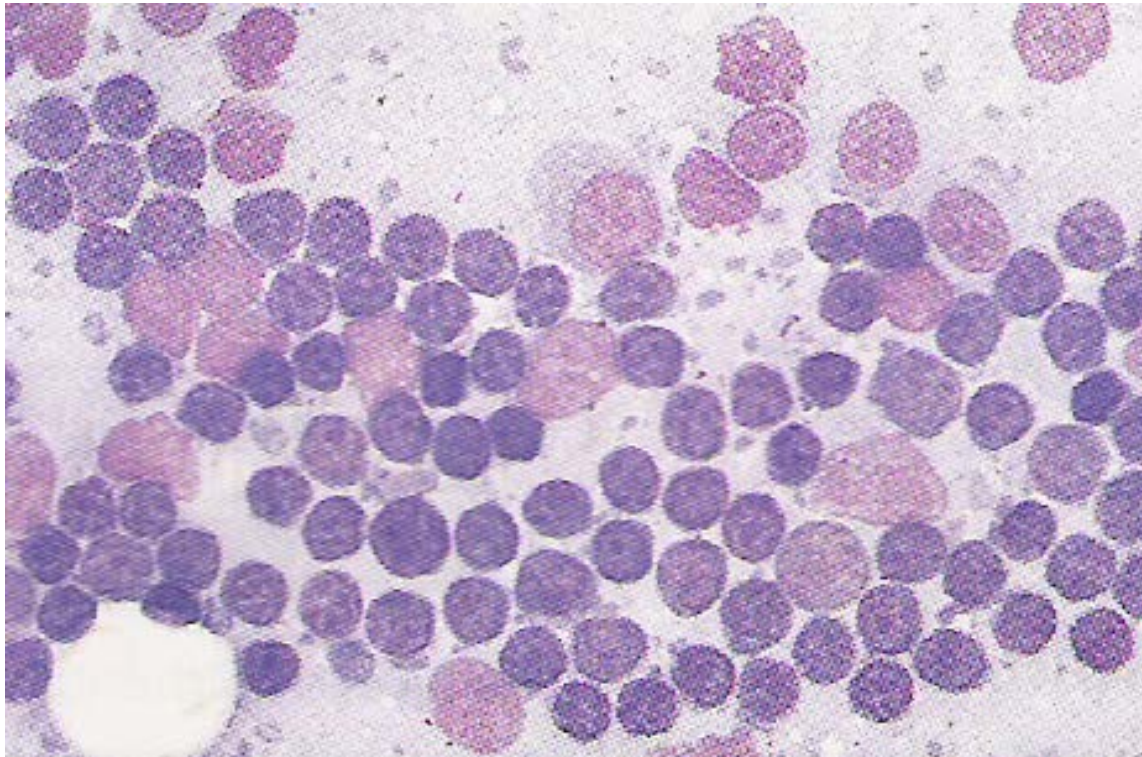
Péritonite biliaire



Cytologie des nœuds lymphatiques

- Nœud lymphatique normal:
 - Ponction souvent difficile et ϕ faible
 - $>85\%$ des ϕ sont des petits lymphocytes matures
 - Autres ϕ : lymphocytes intermédiaires, grands lymphocytes, plasmocytes, mastocytes et macrophages

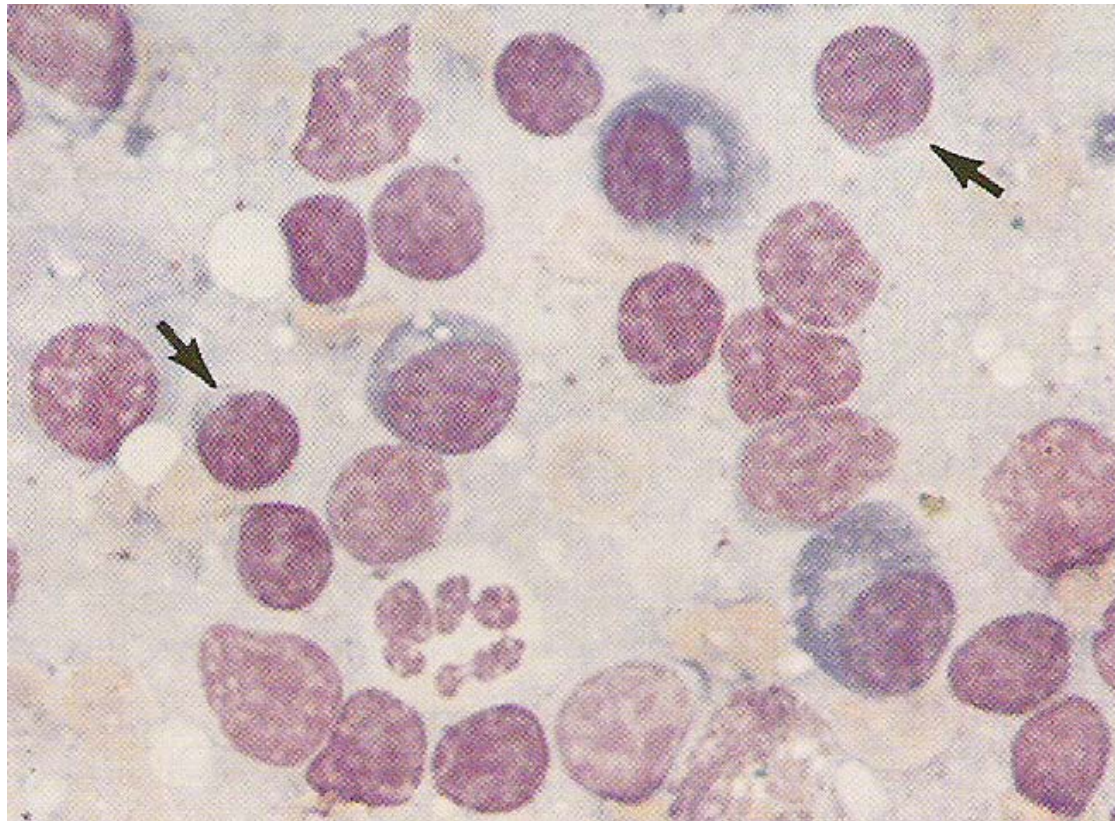
Cytologie des nœuds lymphatiques



Cytologie des nœuds lymphatiques

- Nœud lymphatique réactionnel:
 - Réponse proliférative non-néoplasique suite à une stimulation antigénique
 - Prédominance de petits lymphocytes matures
 - Proportion plus élevée de lymphocytes immatures et de plasmocytes
 - N.L. sous-mandibulaires sont plus souvent impliqués à cause de l'importante stimulation antigénique

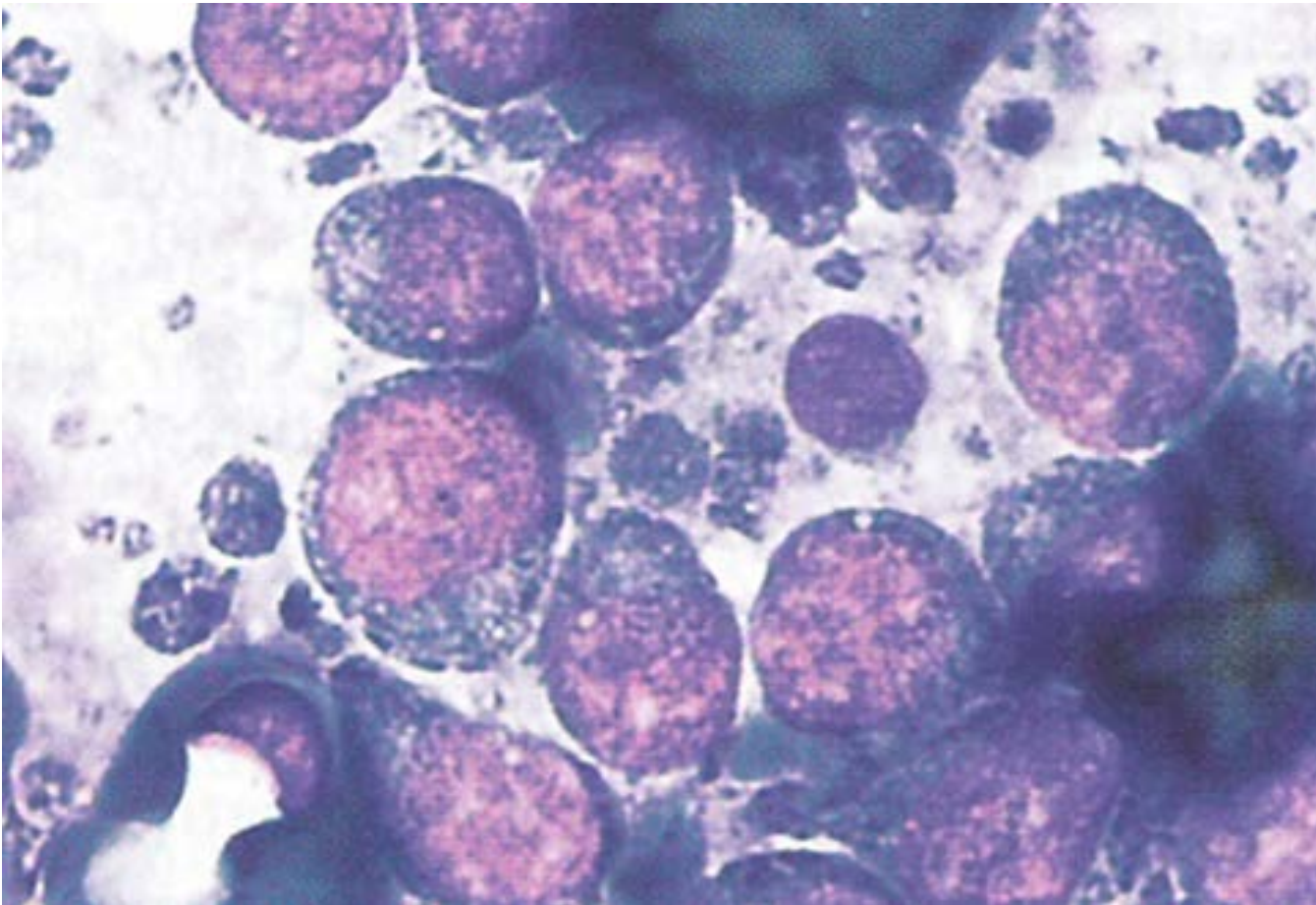
Cytologie des nœuds lymphatiques



Cytologie des nœuds lymphatiques

- Lymphome:
 - Transformation néoplasique de grands lymphocytes
 - Grands lymphocytes >50%, mais généralement > 80%

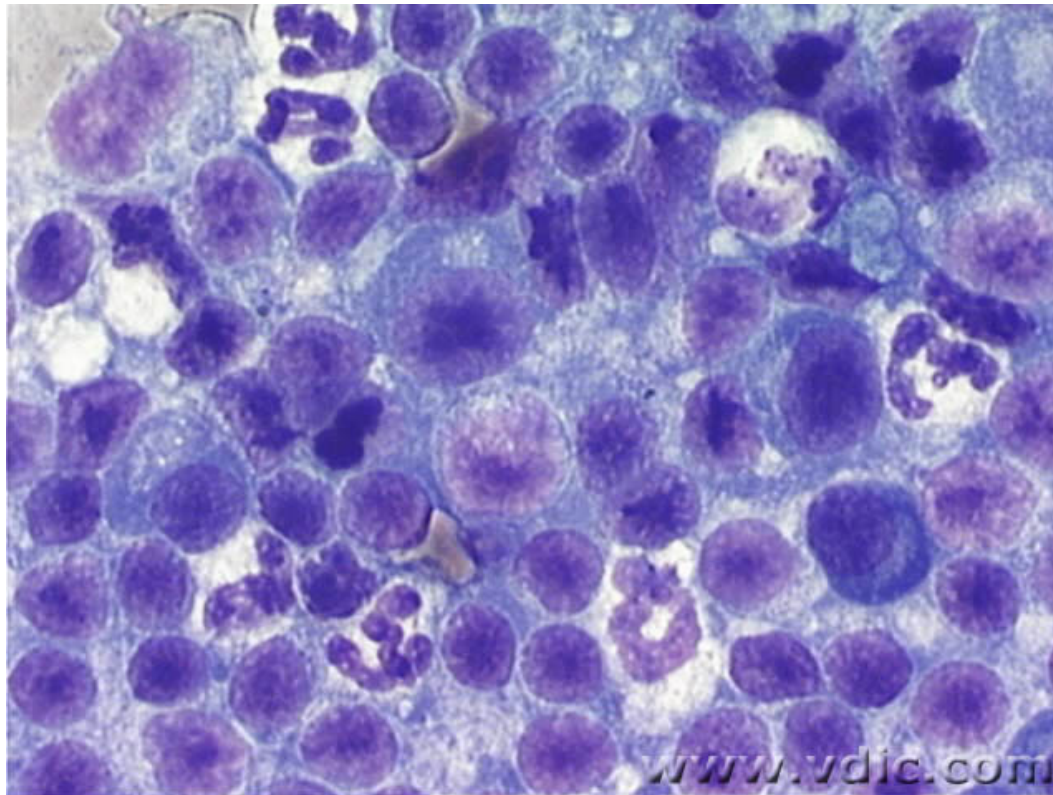
Cytologie des nœuds lymphatiques



Cytologie des nœuds lymphatiques

- Lymphadénite:
 - Inflammation neutrophilique, mixte, granulomateuses ou éosinophilique
 - Évaluation de la présence de micro-organismes
 - Souvent accompagnée par une hyperplasie lymphoïde réactionnelle

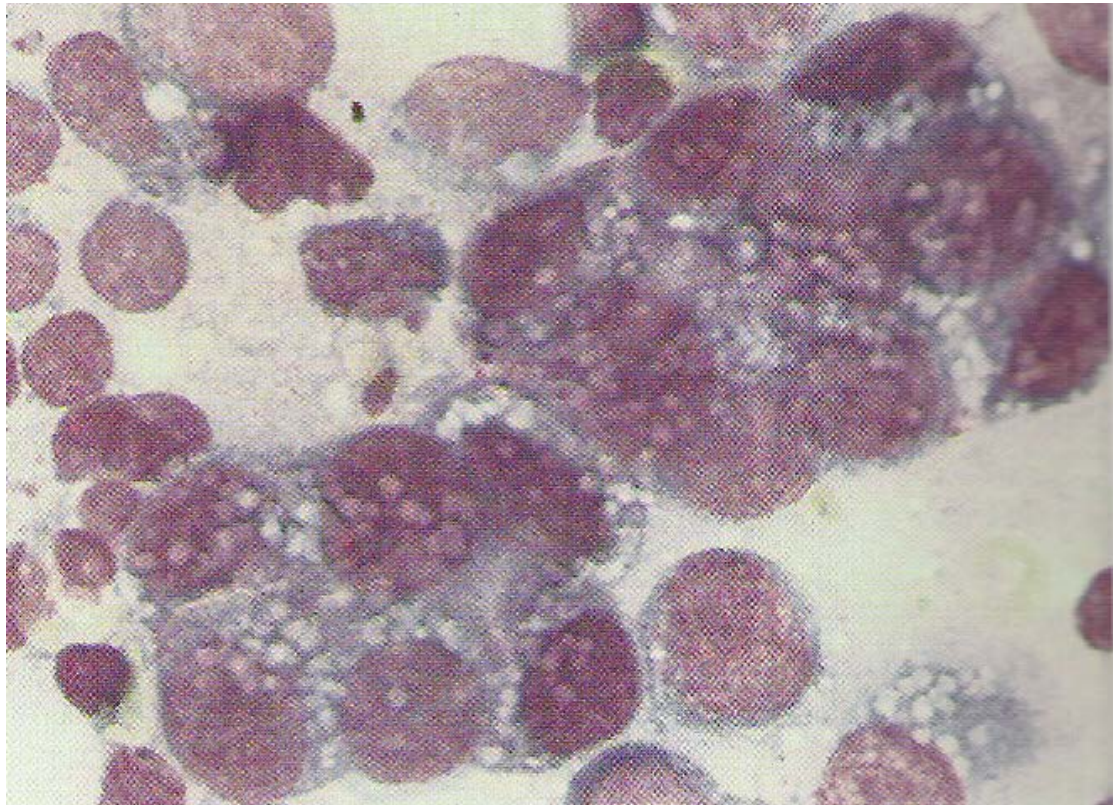
Cytologie des nœuds lymphatiques



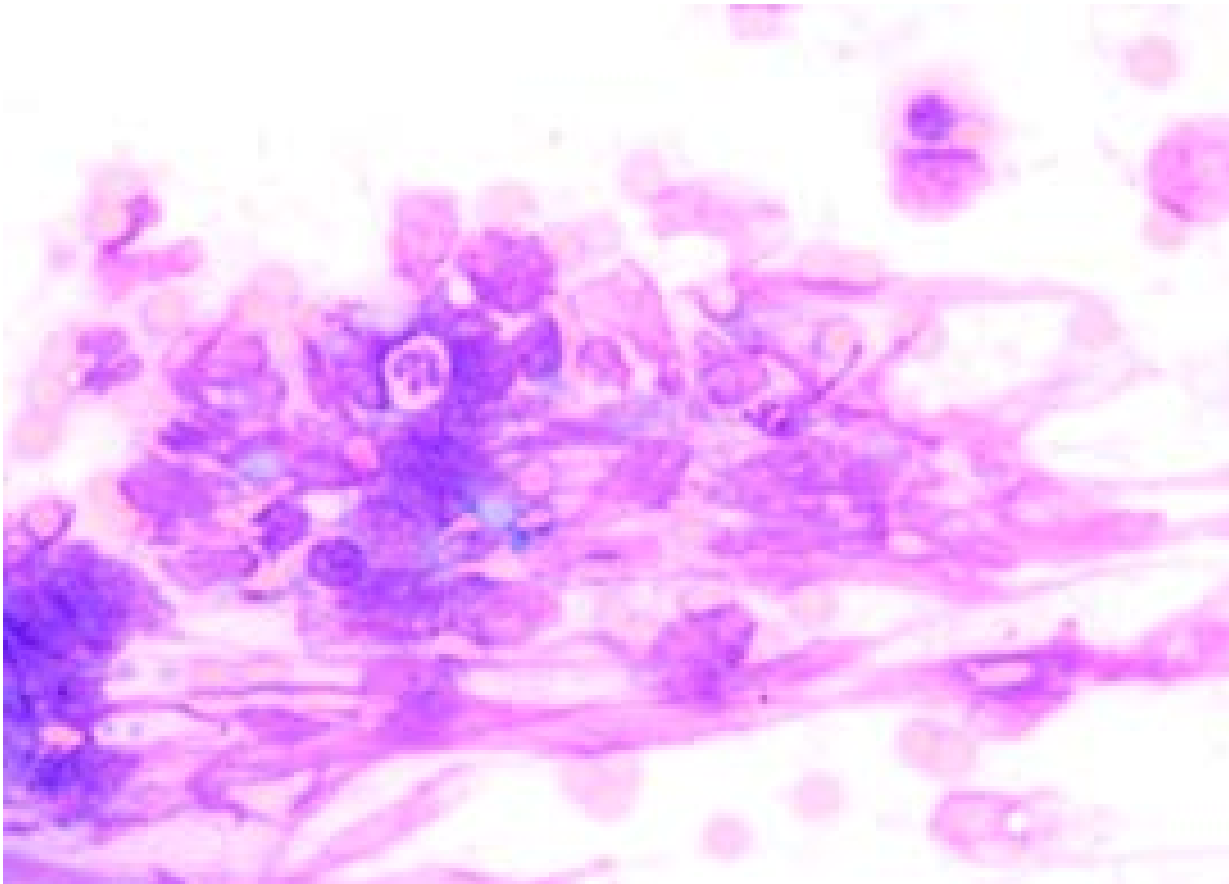
Cytologie des nœuds lymphatiques

- Métastases a/n d'un N.L.
 - Ç normalement absente d'un N.L. démontrant généralement des critères de malignité
 - Ex. Bilan d'extension d'un mastocytome, d'une tumeur mammaire, etc.

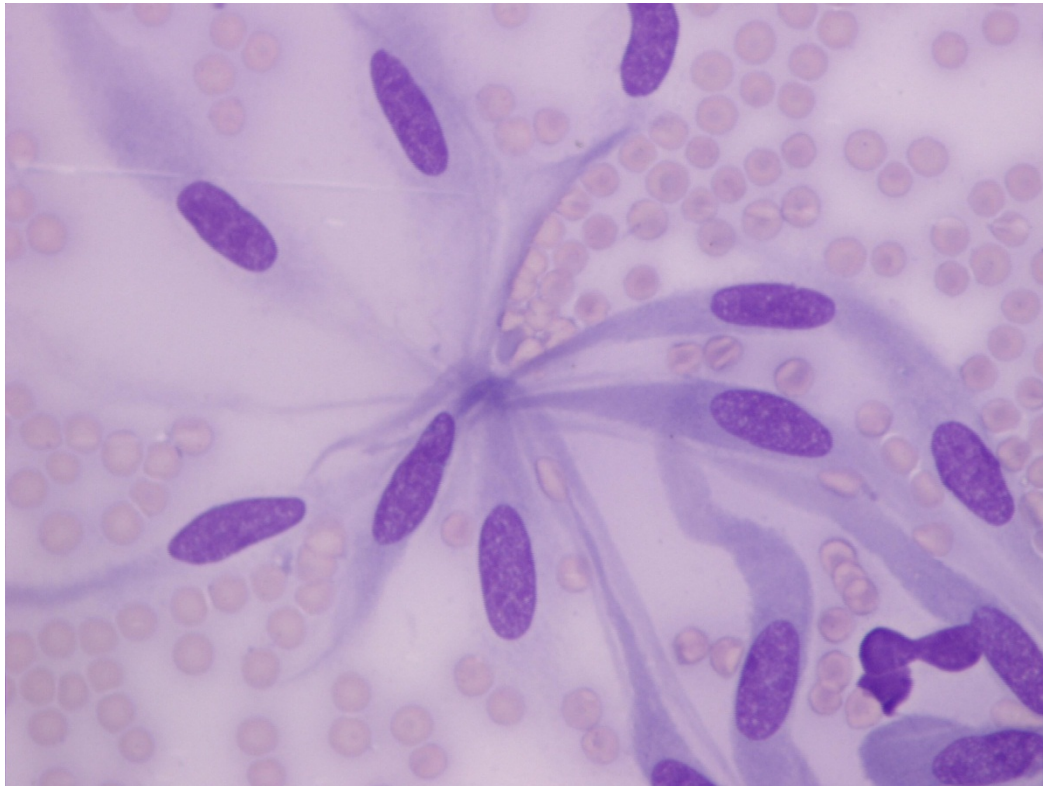
Cytologie des nœuds lymphatiques



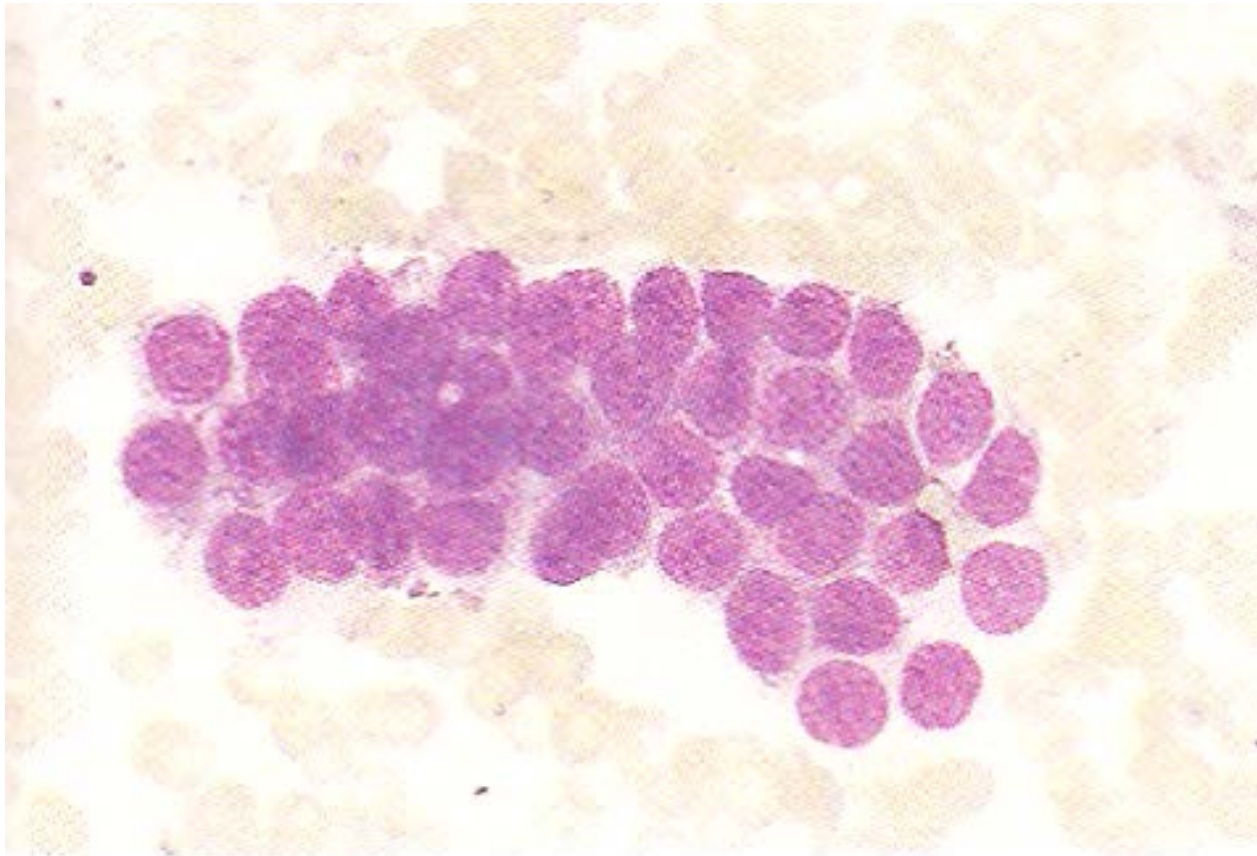
Exercices!



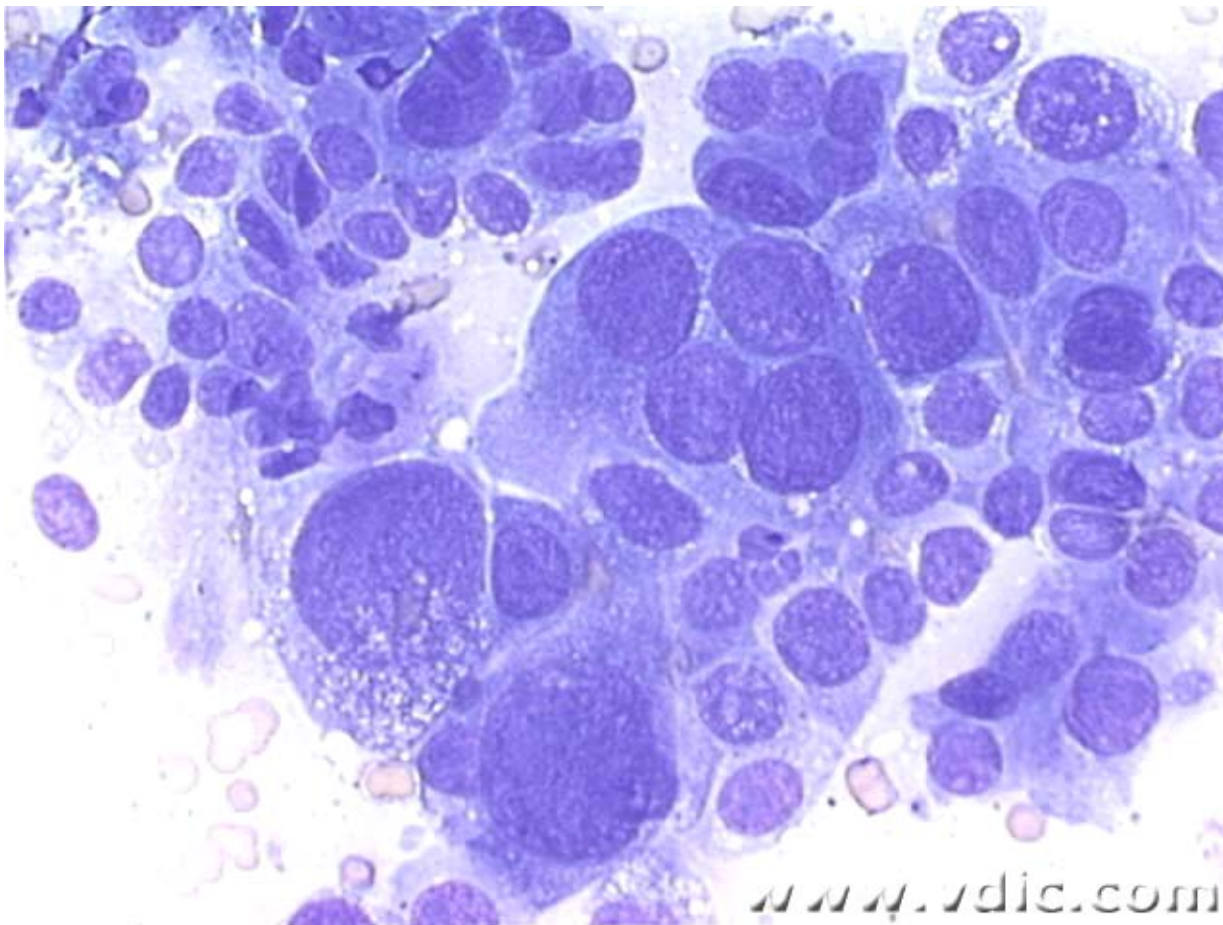
Exercices!



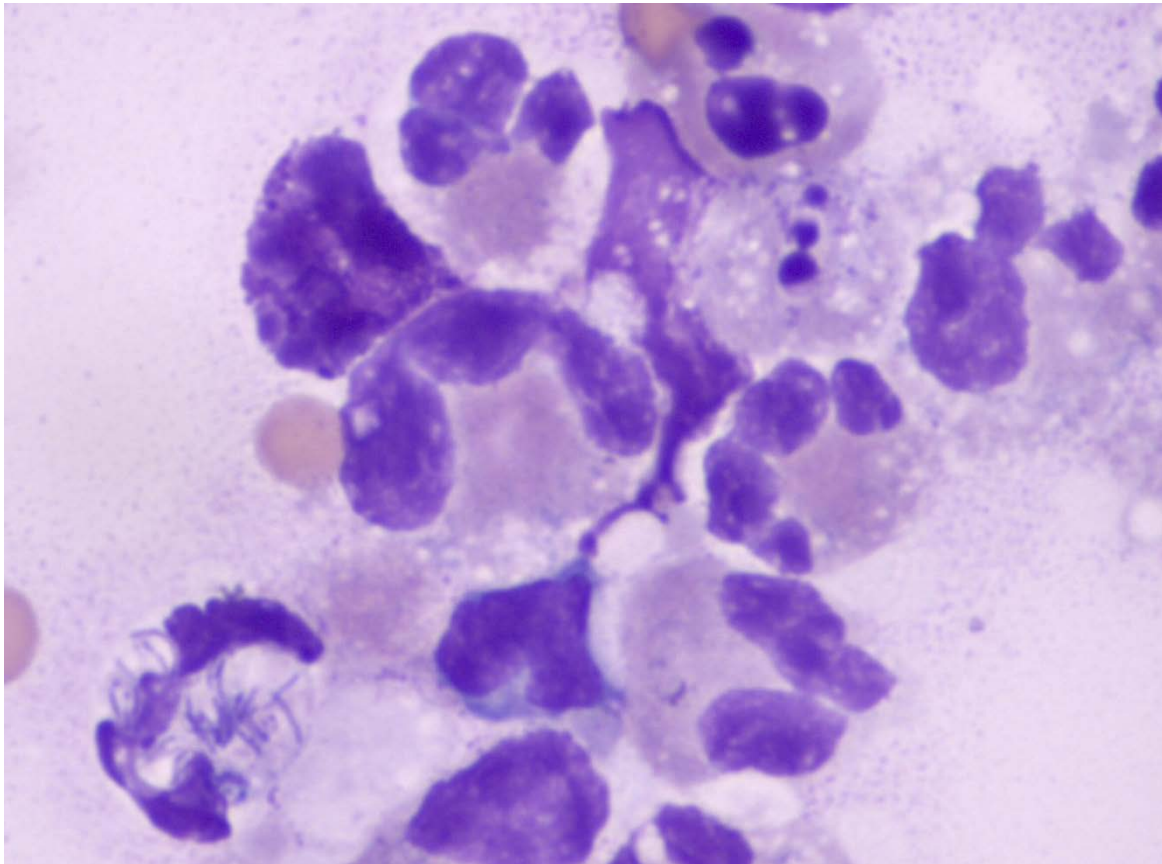
Exercices!



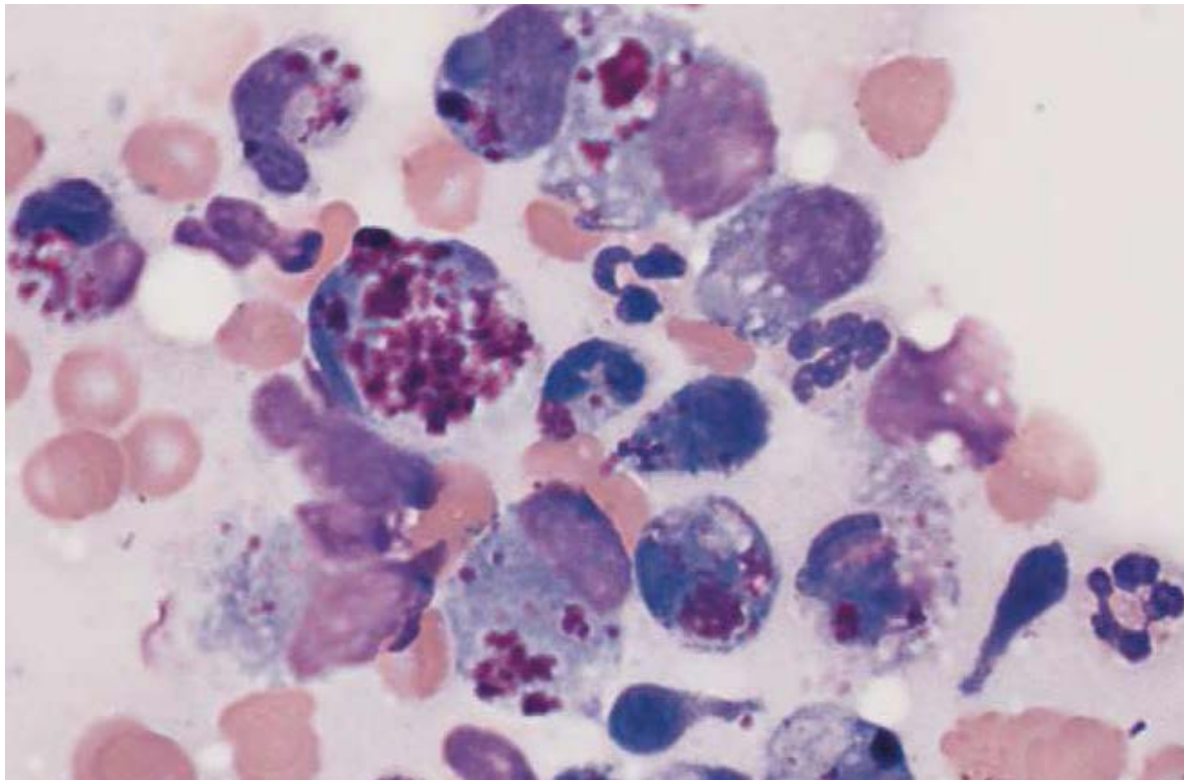
Exercices!



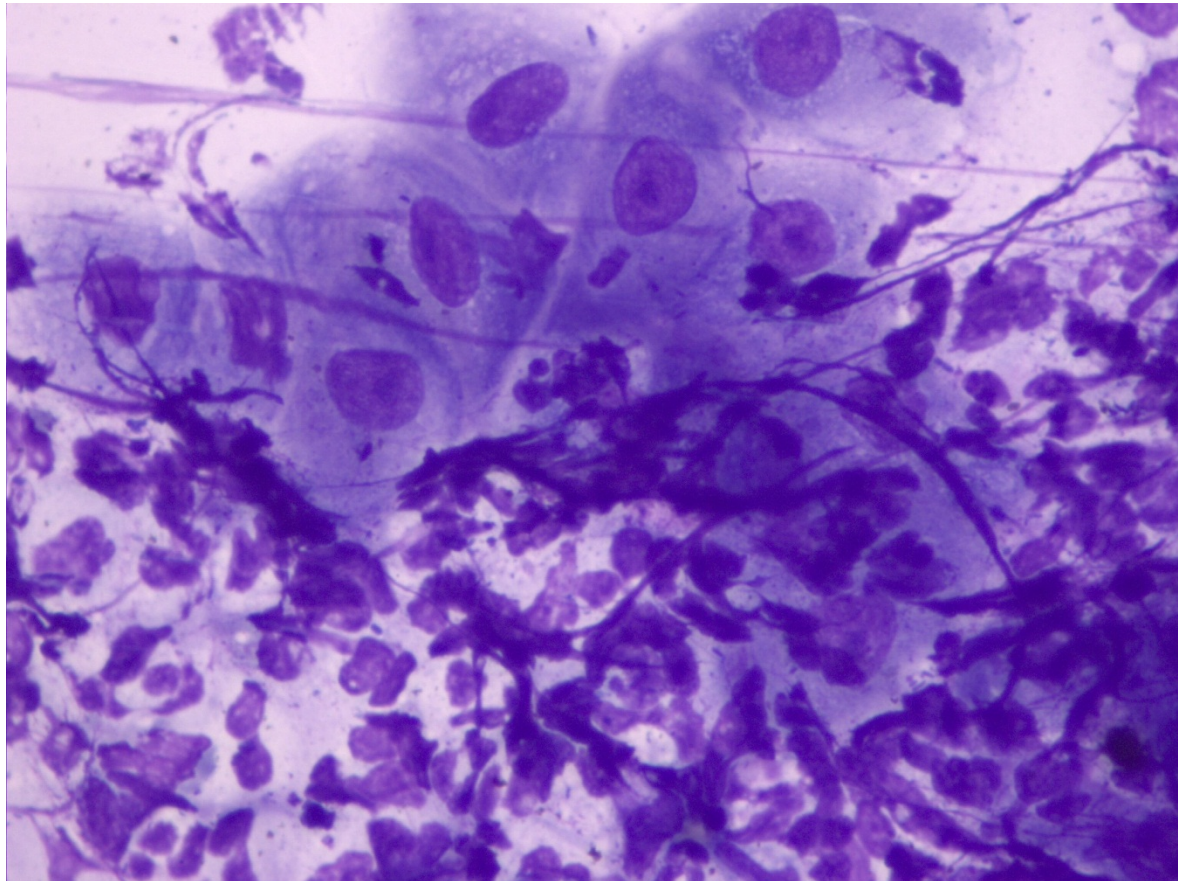
Exercices!



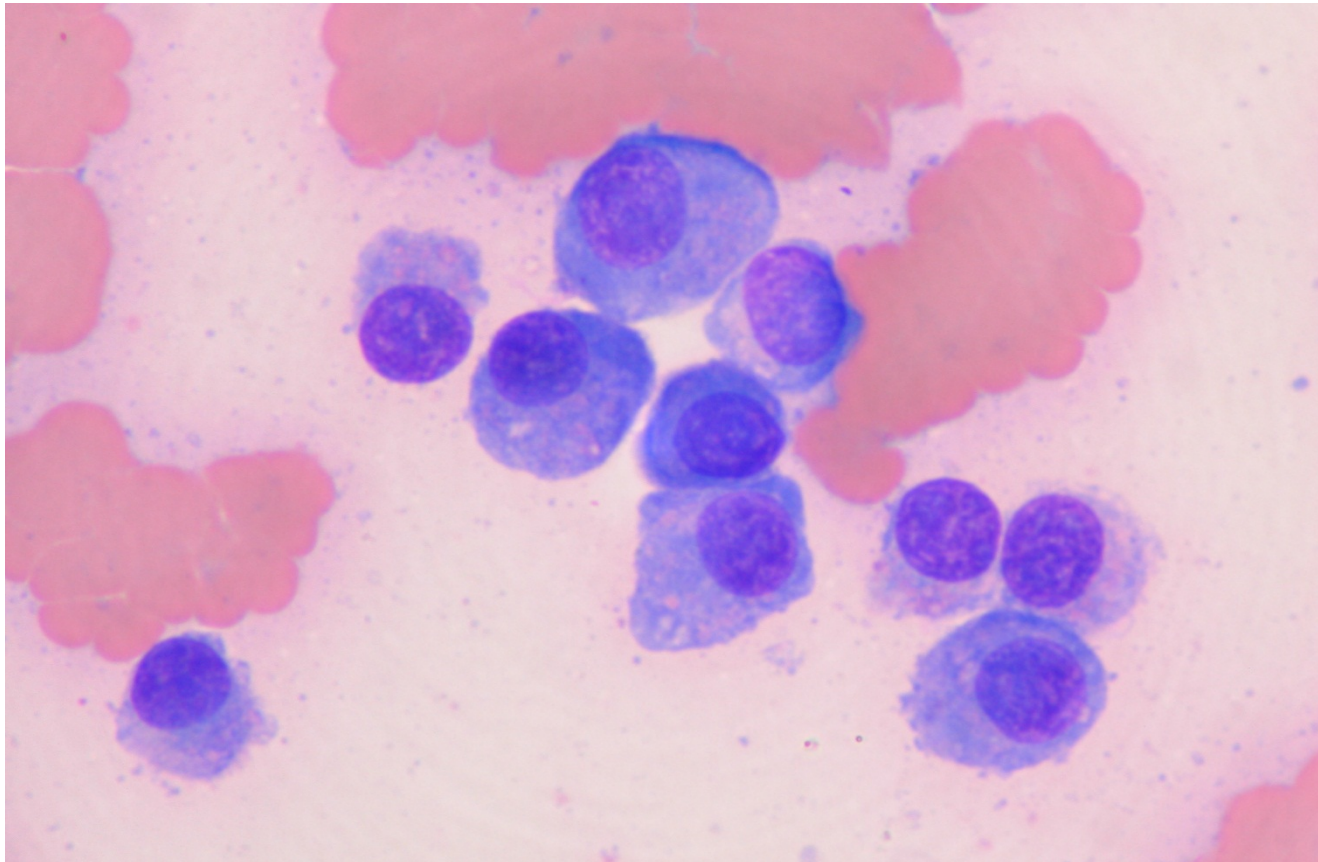
Exercices!



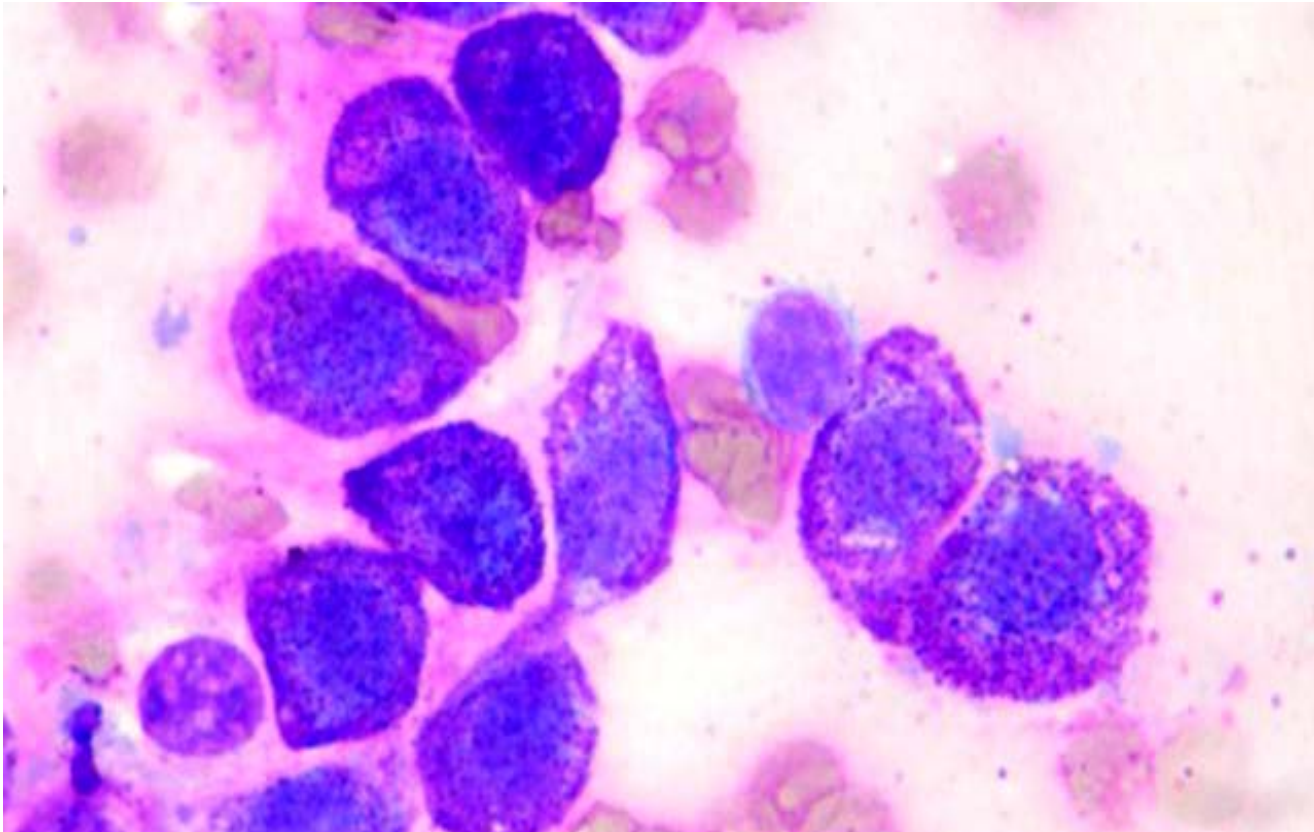
Exercices!



Exercices!



Exercices!



Exercices!

