

Les différentes techniques de prélèvements en cytologie cutanée

L. PIANE, DV, Dip. ECVCP

J-C. HUSSON, DV, Dip. ECVCP

Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire du Sud-Ouest (LAPVSO), 11bis allée de Vitarelles 31100 Toulouse.

Déclaration de lien d'intérêts sous la responsabilité du ou des auteurs : Néant.

OBJECTIFS PÉDAGOGIQUES

> Être capable de :

- savoir quel type de technique de prélèvements utiliser en fonction du type de lésion ;
- connaître les étapes pré-analytiques nécessaires à l'obtention d'un prélèvement interprétable.

CRÉDITS DE FORMATION CONTINUE

La lecture de cet article ouvre droit à 0,05 CFC.

Les différents types de prélèvements en cytologie cutanée dépendent de la nature même de la lésion. Il est important d'en connaître les caractéristiques et les limites afin de choisir la technique la plus appropriée pour un résultat optimal.

Pour obtenir un diagnostic cytologique de qualité, il convient avant tout de respecter les différentes étapes pré-analytiques. Le prélèvement effectué doit être de bonne qualité et représentatif de la lésion. La technique utilisée doit être adaptée à la nature de la lésion. L'étalement doit respecter les cellules et la coloration doit permettre de visualiser les détails cytonucléaires.

Les lames utilisées doivent être préalablement dégraissées et correctement identifiées au crayon à papier sur leur côté maté.

Les différentes techniques de prélèvements

Le calque par apposition ou par étalement

La technique du calque par apposition est appropriée pour certaines lésions superficielles (pustules, croûtes après avoir détaché ces dernières), lors de séborrhée grasse, sur des lésions suintantes à érosives, dans les ulcères peu profonds.

■ Calque par apposition

Pour les lésions ulcérées recouvertes de sérosités séchées il peut être préférable de racler la surface au préalable.

La lame est saisie entre le pouce et le majeur, l'index étant posé au milieu de la lame.

La lame est appliquée sur la peau, en effectuant une contre-pression avec l'index (PHOTO 1).

Il convient d'éviter de faire glisser la lame afin de limiter les artefacts d'étalement. L'opération est répétée plusieurs fois au même endroit.

■ Calque par étalement

Pour les pustules, il convient d'utiliser la technique du calque par étalement.

La technique est la même que celle du calque par apposition, après avoir rompu le toit de la pustule, soit avec le coin tranchant de la lame, soit avec une aiguille.

Le matériel est alors étalé, soit en utilisant le bord rodé d'une autre lame inclinée à 30° comme un frottis sanguin, soit en l'écrasant avec une autre lame posée à plat, perpendiculairement ou parallèlement [1-2].

Le scotch-test (ou test à la cellophane adhésive)

Le scotch-test peut être utilisé pour des lésions érythémateuses, sèches à peu



Photo 1. Calque par apposition.



Photo 2. Scotch-test.



Photo 3. Cytoponction à l'aiguille fine.

suintantes (séborrhée sèche, lichénification), en particulier au niveau des plis (ex : espaces interdigités, bourrelets unguéaux, creux axillaires, creux inguinaux...).

L'objectif est de récolter les éléments cellulaires, micro-organismes (bactéries, levures...) et autres débris présents.

Un morceau de scotch Crystal de 3 cm est découpé, puis la partie collante est appliquée directement sur la peau en écartant les poils et en exerçant une pression digitée pour obtenir un bon contact, puis retirée d'un mouvement sec (PHOTO 2).

L'opération est répétée une à deux fois de suite [1-2].

L'écouvillonnage ou le cytobrossage

La technique par écouvillonnage ou cytobrossage convient pour la récolte de matériaux superficiels ou d'exsudats (ex : conduit auditif externe, contenu des lésions anfractueuses ou fistuleuses), pour les lésions des plis ou encore pour la récolte de cellules épithéliales lors de stomatite par exemple.

Le matériel à étaler est recueilli par écouvillonnage (écouvillon en coton bien humidifié avec du sérum physiologique ou cytobrosse).

L'écouvillon (ou la cytobrosse) est ensuite apposé sur la lame, puis roulé tout le long de celle-ci et sur l'ensemble de sa largeur par deux ou trois passages juxtaposés, toujours dans le même sens [1-2].

La cytoponction à l'aiguille fine

La cytoponction à l'aiguille fine est la technique préférentielle lors de lésions surélevées (plaques, nodules, masses), d'autant plus si la peau est intacte en surface.

On notera toutefois que le calque par apposition d'une lésion surélevée ulcérée peut parfois être diagnostique mais le matériel sera souvent fortement contaminé (inflammation, sang) compliquant l'interprétation de la cytologie. Il n'est pas nécessaire de tondre avant la ponction, une simple désinfection du site suffit.

Deux techniques de prélèvements peuvent être utilisées en fonction de type de lésion à ponctionner : la technique par aspiration et la technique par carottage.

Technique par aspiration

Pour la technique par aspiration, la masse est maintenue fermement dans une main.

L'aiguille (21 ou 25G) montée sur la seringue (3 à 5 mL) tenue par l'autre main est introduite tangentielle à la surface de la masse et une pression négative est exercée en tirant le piston jusqu'aux trois quarts du volume de la seringue.

L'aiguille est redirigée trois à six fois en gardant la pression négative sans que la pointe de l'aiguille ne sorte de la masse.

La pression exercée ne doit être ni trop forte ni trop prolongée, afin d'éviter que des vaisseaux sanguins ne se rompent entraînant ainsi une contamination sanguine du prélèvement. Après avoir prélevé

différentes zones de la masse, la seringue est relâchée et l'aiguille retirée [3-5].

Technique par carottage

La méthode par carottage sans aspiration permet d'obtenir des prélèvements de qualité similaire, voire meilleure, par rapport à la technique par aspiration standard.

La procédure est la même, si ce n'est qu'aucune pression négative n'est exercée sur le piston. Un peu d'air est aspiré dans la seringue avant de procéder au prélèvement (PHOTO 3).

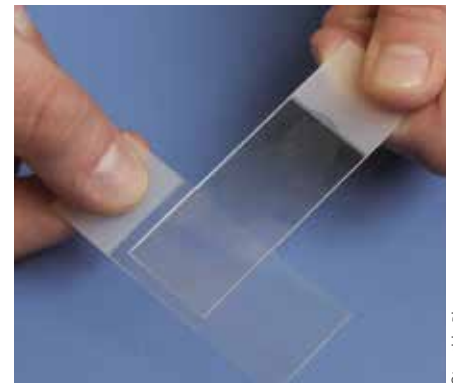
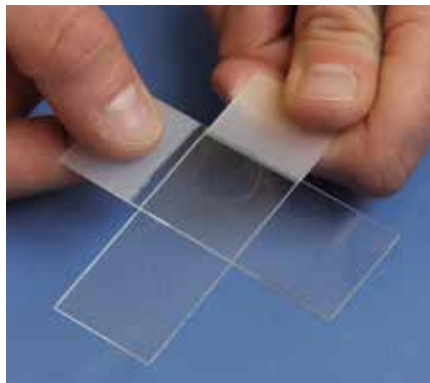
La ponction peut également se faire avec l'aiguille démontée, en la tenant directement entre ses doigts. Le principal avantage de cette technique est de réduire significativement la contamination sanguine.

Le choix de la méthode est à la préférence du clinicien. Néanmoins, pour des tissus fermes, la technique par aspiration est recommandée, tandis que, pour des tissus mous ou vascularisés, la technique par carottage sera préférée.

La taille de l'aiguille et le volume de la seringue utilisés sont également à adapter en fonction de la lésion.

Plus le tissu est mou (type nœud lymphatique), plus le diamètre de l'aiguille et le volume de la seringue utilisés seront petits.

Pour les tissus fermes (type fibrosarcome) une aiguille de plus gros diamètre (20G) est parfois nécessaire. Le risque d'hémodilution augmente cependant avec le diamètre de l'aiguille [3-5].



©Laetitia Plane

Photos 4. Étalement sur lame d'un prélèvement tissulaire.

Préparation des lames

■ Technique de préparation pour les lésions tissulaires

Les frottis obtenus à partir d'aspiration de masses tissulaires doivent être préparés par la technique d'écrasement délicat.

Un peu de matériel est déposé délicatement, à environ 0,5 cm du côté maté de la lame. Une seconde lame est placée sur la première, perpendiculairement à celle-ci. Le matériel est pressé délicatement mais fermement entre les deux lames.

La lame du dessus est glissée le long de la première, dans un mouvement continu et délicat (PHOTOS 4A, 4B ET 4C).

Un étalement de bonne qualité est caractérisé par un prélèvement monocouche de forme oblongue. Si trop de matériel est déposé, l'étalement sera trop épais.

Si la pression exercée au moment de l'étalement est trop forte, un nombre important de cellules risquent d'être rompues, rendant ainsi le frottis illisible [3-5].

■ Technique de préparation pour les lésions liquidiennes

Si du liquide est présent au sein de la masse, il doit être aspiré en totalité et traité comme tel. Le liquide doit être recueilli sur tube EDTA afin de préserver au mieux la morphologique des cellules.

Une petite goutte de liquide est placée à environ 0,5 cm du côté maté de la lame. Une seconde lame est glissée vers l'arrière selon un angle de 30 à 40 degrés jusqu'à ce qu'elle entre en contact avec la goutte.

Lorsque le fluide s'est étalé vers les côtés le long du sillon entre les deux lames, la seconde lame est glissée délicatement vers l'avant jusqu'à ce que tout le liquide se soit écoulé (FIGURE 1).

La fin du frottis ne doit pas dépasser celle de la lame pour permettre, notamment, la visualisation des cellules de grande taille, qui se retrouvent le plus souvent en queue de frottis.

La vitesse d'étalement dépendra de la viscosité du liquide : plus le liquide est fluide et plus l'étalement devra être rapide.

Si le liquide est visqueux, l'étalement devra être lent et constant, et réalisé par écrasement comme pour les lésions tissulaires [3-5].

Le liquide doit ensuite être centrifugé (1 000 à 1 500 tours/min pendant

5 minutes) pour concentrer les cellules. Le surnageant est séparé du culot et ce dernier est remis en suspension en tapotant délicatement la paroi du tube. Un nouvel étalement est réalisé.

Il est toutefois à noter que lors de lésions kystiques, les étalements peuvent se révéler trop peu cellulaires pour être conclusifs.

De nouvelles cytoponctions peuvent alors être réalisées en périphérie de la lésion dans du tissu plus ferme, mais il est parfois préférable de réaliser directement une analyse histologique.

Le TABLEAU 1 résume les indications, avantages et inconvénients des différentes techniques de prélèvement en cytologie cutanée.

Figure 1. Étalement sur lame d'un prélèvement liquidienn

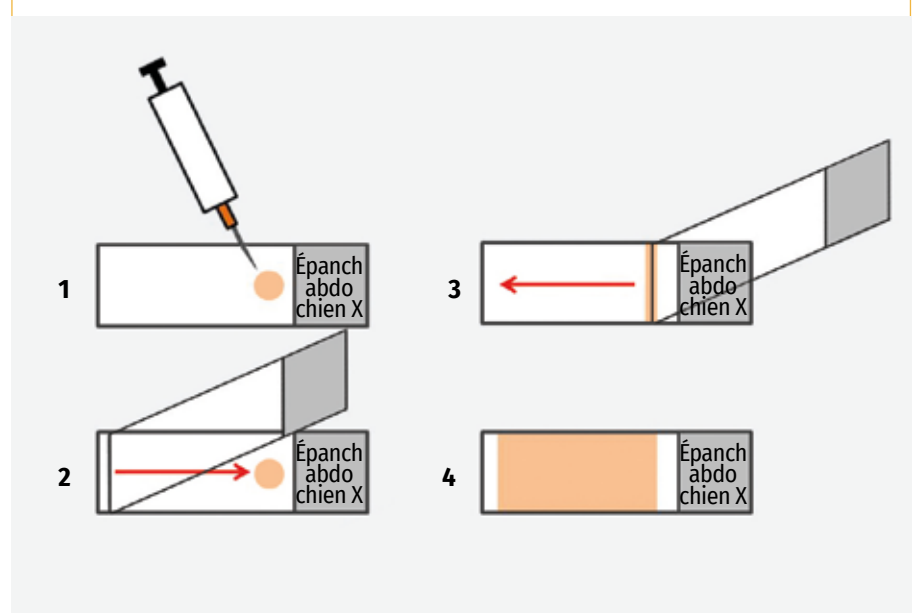




Tableau 1. Indications, avantages et inconvénients des différentes techniques de prélèvement en cytologie cutanée.

	Indications	Avantages	Inconvénients
Calque	Lésions de surface "humides" (pustules, croûtes, érosions), tout exsudat superficiel à profond	Facile à réaliser Non invasif et rapide	Parfois non représentatif de la lésion (lésions ulcérées ++)
Scotch-test	Lésions de surface "sèches" Zones difficiles d'accès	Facile à réaliser Non invasif et rapide	Plus difficile à lire au microscope (bulles, débris, poils)
Ecouvillon	Conduit auditif Lésions profondes, fistules	Facile à réaliser Non invasif et rapide	Humidification préalable, parfois peu cellulaire
Cytoponction	Toutes les lésions en relief (nodules, plaques) ulcérées ou non Cytologie tumorale ++	Polyvalence et puissance diagnostique quand bien réalisée, Non invasif et rapide	Technicité relative Artéfacts, sang, gras, prélèvements acellulaires

Bonnes pratiques après l'étalement

Séchage

Après étalement, les lames doivent être séchées rapidement par agitation à l'air libre (ou à l'aide d'un sèche-cheveux en position froide).

Les frottis de matériel gras doivent être laissés à sécher pendant environ 24 heures avant d'être colorés.

Coloration rapide

Il existe plusieurs sortes de colorations dites rapides, accessibles aux praticiens (exemple : coloration RAL 555). Une lame peut être insuffisamment colorée si les temps de coloration sont inappropriés, les colorants trop utilisés ou trop vieux, ou si le prélèvement est incorrect (trop épais).

La fréquence de changement des colorants dépend du nombre de lames pour lesquelles ils ont servi, mais on conseille de les renouveler au moins une fois par

semaine. Ils doivent être complètement remplacés lorsque des pigments libres, des agents infectieux ou des éléments cellulaires inappropriés sont retrouvés sur les lames.

Concernant le scotch-test, ce dernier ne doit surtout pas être trempé dans le premier pot (fixateur) qui conduirait à une dissolution de la colle du ruban adhésif et la détérioration du prélèvement.

Les temps de trempage dépendent de l'épaisseur du matériel et de la fraîcheur du colorant. Pour les prélèvements de nœuds lymphatiques par exemple, les temps de trempage doivent être augmentés pour obtenir une coloration optimale [3-5].

Il existe des colorations plus longues à réaliser que les colorations rapides de type RAL, comme celles de May Grünwald-Giemsa (MGG). C'est la coloration utilisée dans les laboratoires de référence, elle permet d'obtenir des cytologies de meilleure qualité en rendant les détails cytonucléaires plus perceptibles.

Cette coloration est particulièrement adaptée à la cytologie des lésions nodulaires obtenues par cytoponction à l'aiguille fine.

Envoi des échantillons à un laboratoire de référence

Avant l'envoi de tout prélèvement à un laboratoire de référence, il convient de bien se renseigner sur les modalités d'acheminement. Les liquides doivent être placés dans des tubes EDTA afin de préserver au mieux la morphologie des cellules.

Des étalements directs et de culots obtenus après centrifugation doivent être impérativement réalisés au chevet du malade.

Les lames doivent absolument être placées dans des boîtes de transport appropriées au risque d'être cassées et non exploitables. Il est impératif d'éviter tout contact avec des vapeurs de formol, que ce soit au moment du prélèvement ou au moment du transport afin d'éviter tout problème de coloration ultérieur. L'utilisation préalable de fixateur est par ailleurs à proscrire.

Il est en outre préférable de transmettre des prélèvements non préalablement colorés avec des colorants rapides type RAL 555 afin d'en optimiser l'interprétation [3-5].

MÉMO

- Le calque ou le test à la cellophane adhésive sont indiqués lors de lésions superficielles ou sur les lésions plus profondes mais ouvertes ou ulcérées. Le choix de la méthode va dépendre de l'accessibilité de la zone cutanée et le caractère sec ou suintant des lésions.
- La cytoponction à l'aiguille fine est la technique de choix pour les lésions surélevées (plaques, nodules) d'autant plus si la peau est intacte. Le choix de la méthode (aspiration vs carottage) va dépendre de la fermeté du tissu et du caractère hémorragique de la lésion.
- Lors de lésions kystiques, des étalements au chevet du patient sont impératifs et le liquide prélevé doit être placé sur tube EDTA pour permettre une meilleure conservation des cellules.
- Il est nécessaire d'éviter tout contact entre les prélèvements cytologiques et les vapeurs de formol.

>>À LIRE...

1. Albanese F. Canine and feline skin cytology. A comprehensive and illustrated guide to the interpretation of skin lesions via cytological examinations. Cham : Springer ; 2017.
2. Miller WH et coll. Muller & Kirk's Small animal dermatology. 7th ed. Saint Louis : Elsevier ; 2013.
3. Meinkoth JH, Cowell RL. Sample collection and preparation in cytology : increasing diagnosis yield. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002 ; 32 : 1187-207.
4. Meyer DJ. The acquisition and management of cytology specimens. In : Raskin RE, ed, Canine and feline cytology : a color atlas and interpretation guide. Saint Louis : Elsevier ; 2016 : 1-15.
5. Meinkoth JH et coll. Sample collection and preparation. In : Cowell RL, ed, Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. 5th ed. Saint Louis : Elsevier ; 2020 : 1-17.