

Mise au point d'une nouvelle approche des Méthodes de coloration cytologique : Avantage en temps, économie, et santé

PERFECTING OF A NEW APPROACH OF CYTOLOGICAL COLORATION METHODS : ADVANTAGE IN TIME, ECONOMICS AND HEALTH.

Faye O¹.

Résumé :

Pour réduire le risque d'exposition toxique au toluène, le coût et la durée des techniques dans les colorations pour cytodagnostic, nous avons mené une expérimentation en 18 mois portant sur 240 étalements constitués de frottis cervico-vaginaux.

Notre cadre d'étude a été le Laboratoire d'histologie, Embryologie, Cytogénétique de la Faculté de Médecine de l'Université Cheikh Anta DIOP de Dakar (Pr. Afoutou), et notre exemple d'application a été la coloration de Papanicolaou (comme exemple de coloration cytologique).

- Les 240 frottis cervico-vaginaux ont été traités comme suit : 120 frottis cervico-vaginaux (la moitié) ont été colorés selon la technique conventionnelle de papanicolaou qui utilise l'acide chorydrique pour la différenciation et le toluène comme liquide d'attente avant le montage ; les 120 restants ont été colorés selon la technique de Papanicolaou que nous avons modifiée (nouvelle approche), en supprimant d'une part, l'usage de l'acide chlorhydrique pour la différenciation, et d'autre part en supprimant totalement l'usage des bacs de toluène avant le montage, bacs de toluène que nous avons remplacés par des bacs d'éthanol ;

A la comparaison, les lames traitées par la nouvelle méthodologie (sans usage d'acide chlorhydrique et sans usage de toluène) et les lames traitées selon la méthode conventionnelle habituelle présentaient des qualités identiques : qualités tinctoriales, qualités de montage; par ailleurs, ces qualités se sont conservées pendant au moins les 12 mois au cours desquels nous avons effectué un contrôle de conservation par lectures périodiques de toutes les lames ;

En conclusion, le bilan de la nouvelle approche a été :

- 1 - une réduction de la durée et du coût des techniques, en rapport avec les temps supprimés de toluène et d'acide chlorhydrique, et également en rapport avec le coût de ces produits.
- 2 - une réduction notable du risque d'exposition aux toxiques, principalement au toluène par suppression de tous les bacs de toluène précédant le montage.

Mots Clés : Coloration-Papanicolaou-montage-toluène-éthanol.

Summary

To reduce the toluene toxicity exposure, the cost and the time of coloration technic for diagnosis in cytology, we have carried an experience during 18 months concerning 240 cervical and vaginal smears.

Our study took place in the histology-embryology-cytogenetic laboratory of Dakar medecine faculty.

- Our samples of coloration were the Papanicolaou coloration.: 120 smears (the half) were colored according the conventional Papanicolaou technic wich use chlorydric acid for differenciation, and toluene during sticking small strips on slides; the others 120 smears were colored according our new approach where we have modified the conventional Papanicolaou technic by suppression of the chlorydric acid in the differenciation, and suppression also of the toluene: ethanol was used in place of toluene.

The comparison between the new approach and the conventional method has showed that the two technics give the same results; we have also check that there results were well preserved during 12 months at least.

In conclusion, the end results of the new approach were :

- 1 - A reduction in working hours and in technics' cost, in line with chlorydric acid and toluene suppression.
- 2 - An important reduction of toxicity exposure risk, principally in connection with toluene suppression.

Key- Words:

Coloration-Papanicolaou-Sticking-Toluene-Ethanol.

1. Introduction

- Le dépistage des cancers en cytologie repose essentiellement sur des colorations, comme par exemple la coloration de Papanicolaou.
- Les automates de coloration avec colleuses automatiques de lamelles sur lames (montage) et les réactifs nécessaires pour les colorations sont chers pour nos pays en voie de développement.
- De plus, certains des produits utilisés, notamment le toluène, le xylène, sont toxiques pour l'homme, toxicité accentuée par la longueur du temps d'exposition à ces produits dans les protocoles de coloration conventionnellement et habituellement utilisés.
- Le but de notre travail était, partant de quelques considérations des aspects physico-chimiques des colorations, de mettre en place une approche de méthode de coloration qui pourrait permettre de réduire, tout en gardant la même efficacité :
 - 1) le coût des techniques,
 - 2) le risque toxique,
 - 3) la durée des techniques,

cela en supprimant l'usage de l'acide chlorhydrique pour la différenciation, mais surtout en supprimant totalement l'usage de toluène ou xylène d'où l'on sortait les lames pour les monter .

2. Matériel et Méthode

- Il s'est agit d'un protocole qui a été expérimenté pendant 18 mois au laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de l'Université Cheikh Anta DIOP (UCAD), et portant sur 240 frottis cervico-vaginaux (FCV). L'expérimentation proprement dite s'est déroulée en 6 mois entre avril 2005 et septembre 2005, et elle a été suivie d'une période d'observation et de vérification de 12 mois, de septembre 2005 à septembre 2006.

Les 240 FCV ont été obtenus comme suit : pendant 6 mois, d'avril 2005 à septembre 2005, chaque mois, 20 patientes ont été choisies au hasard au cours des prélèvements quotidiens pour FCV au laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine de l'UCAD. Pour chacune de ces 20 patientes, 2 FCV ont été étalés sur lames (soit 40 mensuellement), colorés, l'un suivant la méthode conventionnelle habituelle de Papanicolaou (avec passage à l'acide chlorhydrique pour la différenciation, et passage au toluène au moment où l'on doit passer au montage), l'autre suivant notre nouvelle approche **sans acide chlorhydrique** et **sans bain de toluène** : nous avons utilisé l'éthanol à la place du toluène, comme liquide d'attente avant le montage à la colle (eukitt ou entellan) ; les lames colorées séjournaient entre 05 minutes et 06 heures dans l'éthanol avant le montage, temps d'attente programmé pour vérifier la présence ou l'absence de décoloration. Nous avons ainsi choisi de répéter chaque mois, pendant 6 mois, la coloration de 40 FCV, pour vérifier la reproductibilité de la technique.

Les lames obtenues par ces 2 procédés ont été examinées, comparées d'abord à l'œil nu pour apprécier la qualité du montage sans toluène, ensuite au microscope photonique pour apprécier la qualité tinctoriale ; (Voir tableau comparatif des étapes pour: Papanicolaou Conventionnel/Papanicolaou Nouvelle approche).

Tous les frottis colorés depuis le début de l'expérimentation ont été régulièrement ré-examinés une fois par semaine jusqu'au 12^{ème} mois (septembre 2006) après les derniers frottis colorés, dans le but de vérifier le temps de conservation de la coloration dans la nouvelle approche.

Tableau comparatif : Papanicolaou conventionnel / Papanicolaou Nouvelle approche

Technique Conventiennelle		Nouvelle Approche	
H2O	4mn	H2O	3mn
H2O	1mn	H2O	3mn
HTX	4mn	HTX	30sec
H2O	1mn	H2O	2mn
HCl 0,25%	30sec		
H2O	4mn	H2O	2mn
Alcool 95	3mn	Alcool 95 ¹	1mn
		Alcool 95 ²	1mn
OG6	3mn	OG6	3mn
Alcool 95 ¹	1mn	Alcool 95	1mn
Alcool 95 ²	1mn		
EA50	2mn	EA50	3mn
Alcool 95 ³	1mn	Alcool 95	1mn
Alcool 100 ¹	1mn	Alcool 100 ¹	1mn
Alcool 100 ²	1mn	Alcool 100 ²	1mn
		Alcool 100 ³	attente
Toluène ¹	1mn		
Toluène ²	attente		
Montage		Montage	
Temps minimum :	28mn 30sec	Temps minimum :	22mn 30sec

3. Résultats

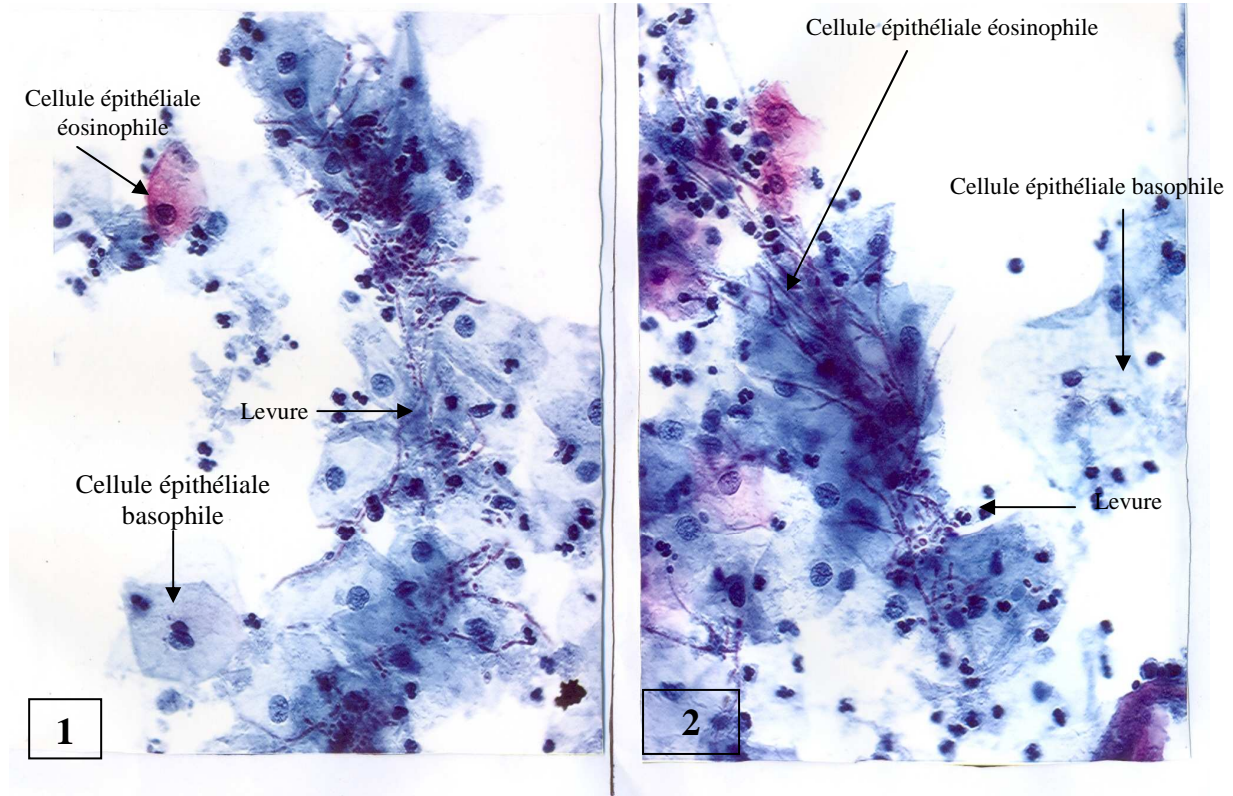
- Toutes les lames traitées sans acide chlorhydrique et sans bain de toluène étaient strictement identiques aux lames colorées selon la méthode conventionnelle classique utilisant des bains à l'acide chlorhydrique et au toluène ; tous les 240 FCV étaient identiques en ce qui concerne :
 - la qualité du montage,
 - la différenciation,
 - et la qualité tinctoriale ;

De plus, aucune nuance de décoloration par attente dans l'éthanol n'a été observée, et le temps minimum de la coloration a été réduit (de 06 minutes dans le cas précis de notre

exemple de coloration), du fait essentiellement de la suppression des temps qui étaient réservés aux passages dans les bacs de toluène.

La photographie 1 représente l'image d'un frottis cervico-vaginal coloré selon la méthode conventionnelle classique (avec des bains à l'acide chlorhydrique et au toluène);

La photographie 2 représente l'image de la deuxième lame de frottis cervico-vaginal de la même patiente : ce deuxième frottis a été coloré selon la nouvelle approche, sans acide chlorhydrique et sans bain de toluène avant le montage.



Photographie 1 : (Papanicolaou) par la méthode conventionnelle (avec acide chlorhydrique et toluène).
Grossissement : X400

Photographie 2 : FCV coloré suivant la nouvelle approche (sans acide chlorhydrique et sans toluène).
Grossissement : X400

4. Discussion

Dans les techniques conventionnelles habituelles de coloration comme par exemple la coloration de PAPANICOLAOU, une étape de différenciation avec l'acide chlorhydrique suit le passage à l'hématoxyline de Harris [1,2]. L'hématoxyline de Harris est un colorant nucléaire basique, en solution aqueuse, et dont le constituant principal est l'hématoxyline [1,2]. La chromatine nucléaire, riche en acides nucléiques, possède une grande affinité pour les colorants basiques ; les bases du matériel génétique (ADN et ARN des noyaux cellulaires) comportent des groupements comme $-C=O$ qui sont de bons donneurs de liaisons hydrogènes, et la formation du complexe [support moléculaire de la substance à colorer (acides nucléiques du noyau)-colorant] se fait par des liaisons

hydrogènes entre le colorant et les bases qui sont fortement colorées en bleu-violet dans le noyau ; par contre, dans le cytoplasme, la présence des groupements hydroxyles sur des constituants des chaînes protéiques permet la solubilité de l'hématoxyline de Harris, d'où la faible coloration du cytoplasme par rapport au noyau [1, 2, 8] ; ainsi donc, avec l'hématoxyline de Harris, les cellules présentent une forte coloration du noyau et une faible coloration du cytoplasme [2, 6, 7, 8], d'où un bref lavage à l'eau (2 x 2 minutes) de ces cellules colorées par l'hématoxyline (soluble dans l'eau) suffit à débarrasser le cytoplasme faiblement coloré de l'hématoxyline, à laver l'excès d'hématoxyline non fixé [2], pendant que le noyau conserve encore une grande quantité du colorant, créant ainsi une bonne différenciation entre le noyau et le

cytoplasme, sans nécessité de faire intervenir l'acide chlorhydrique : la photographie 1 provient d'une lame différenciée par l'acide chlorhydrique, la photographie 2 d'une lame différenciée par simple lavage à l'eau : on observe la même qualité de différenciation ; on obtient ainsi une réduction du temps, mais également une économie du matériel entraînant une réduction du coût.

La forte affinité pour les colorants basiques explique que 30 secondes suffisent pour que les noyaux fixent bien l'hématoxyline, et qu'on n'a donc pas besoin d'attendre 4 minutes dans ce colorant (réduction du temps).

- Certains auteurs [1,2] suppriment l'OG6, colorant cytoplasmique ; ils obtiennent quand même des frottis interprétables, dans la mesure où l'EA50 est également un colorant cytoplasmique [2,6,8] ; si ce procédé marche bien dans des frottis où les affections retrouvées sont essentiellement microbiennes ou parasitaires, avec infection et inflammation, nous ne conseillons pas la systématisation de la suppression de l'OG6, car, dans le cas de frottis présentant des squames, de la parakératose, un certain degré de maturation malpighienne comme dans certains condylomes, dans le cytodagnostic du cancer, l'OG6 est le mieux indiqué pour visualiser ces aspects [3, 4, 5, 10] : l'OG6 est constitué en effet d'orangé G6 à 0,5% dans l'alcool à 95 et d'acide phosphotungstique qui permet de rendre le jaune intense de l'OG6 plus net que dans la coloration cytoplasmique avec l'EA50 seul qui va du jaune au brun-rouge, du fait de la présence à la fois d'acide phosphotungstique et d'éosine, mais aussi de vert lumière et de Brun Bismarck, faisant de l'EA50 un colorant trichrome qui colore à la fois les cellules éosinophiles et les cellules cyanophiles.

- A la fin de la coloration, dans la nouvelle approche, nous avons supprimé totalement l'usage du toluène ou xylène comme liquide d'attente avant le montage

des lamelles sur lames : en effet, dans les techniques conventionnelles, l'entellan ou l'Eukitt (qui permet de coller les lamelles sur les lames) se met en solution dans le toluène au moment du montage : l'eukitt et l'entellan sont miscibles avec le toluène. Dans la nouvelle approche de même, l'eukitt, également miscible à l'éthanol [8,9], forme avec ce dernier une solution qui, entre lame et lamelle, s'étale par capillarité ; il y a solidification de la résine et bonne adhésion lamelle-lame ; nous n'avons pas observé de formation particulière de bulles.

- La suppression de ces bains de toluène a un triple avantage :

1- le temps de la coloration se trouve réduit,

2- le coût de la coloration est réduit, le toluène étant parmi les produits les plus chers des substances commandées en vue de la coloration,

3- L'exposition à la toxicité du toluène des bacs est totalement supprimée pour les colorations cytologiques : quelque soit la coloration cytologique (papanicolaou ou autre comme par exemple la coloration de GUARD), chaque fois que l'on arrive à l'étape de montage d'une lamelle sur une lame, on peut se passer du toluène en utilisant l'alcool absolu (comme solvant) qui va jouer le même rôle de dissolution de la colle (eukitt) que le toluène.

Notre revue de la littérature internationale n'a pas relevé de traité rapportant la suppression totale des bains de toluène parmi les diverses tentatives de simplification des techniques de coloration, ces tentatives ayant plutôt traité de la suppression de l'OG6 ou de la réduction du temps de coloration par réduction du nombre de bains d'une substance, tout en maintenant l'existence et l'usage de cette substance [1-2] ; la comparaison des résultats obtenus dans la nouvelle approche aux résultats donnés par la méthode conventionnelle a montré :

- Une affinité tinctoriale identique,

- Une différenciation nucléo-cytoplasmique identique,
- Une adhésion aussi parfaite des lamelles sur lames,
- Une bonne conservation de la coloration pendant au moins un an ; notre vigilance sera dès à présent retenue par le suivi de ce paramètre **conservation** au-delà d'un an, et par ailleurs, par la démonstration objective de l'applicabilité du principe décrit dans ce travail à l'HISTOLOGIE où actuellement, seule l'étape de déparaffinage peut poser des problèmes de reproductibilité, le montage pouvant s'y faire aisément.

5. Références

- 1 - Kleinman R.L. : Cytologie cervicale et vaginale, et technique simplifiée de Frottis. Rédigé pour le comité médical central de la fédération internationale pour le planning familial, Londres, 1971, 32 pages.
- 2 - Sourabie D. : Contribution à l'Etude des Aspects physico-chimiques de la coloration polychrome de Papanicolaou : application au dépistage des Lésions Précancéreuses et Cancéreuses du Col utérin en milieu Négro-Africain au Sénégal (à propos de 5131 tests de Papanicolaou). Thèse Pharm ; Dakar, 1989, N° 53.
- 3 - Papanicolaou G.M. : Exfoliative cytology. Harvard University Press, Cambridge (Massachusset),1956.
- 4 - Papanicolaou G.M, Traut M.F. : Diagnosis of utérine cancer by the vaginal smear, New York, Commomnwealth Fund, 1943.
- 5 - Riotton G. : Evaluation du dépistage du cancer du col utérin ; de la théorie à la pratique. Bull. Cancer Paris, 1979, 66, 4 : 404-406
- 6 - Certe A. : De l'emploi des matières colorantes dans l'étude physiologique des infusoires vivantes. C.R.Soc. tome 2, 1985, page 197
- 7 - Didier R., Fournier J. : Manuel de chimie organique. Mc graw-Hill. : 1983, page : 59-70.
- 8 - Meybeck J. : Les colorants « que sais-je ? ». N°119, 1963, Paris, 12-104
- 9 - Winnacker K., Kuchner L. : Traité de chimie appliquée. Ed. Eyrolles, Paris, 1968, tome 7.
- 10 - Smoka H., Soost H.J. : Grandes lignes et Atlas du diagnostic par cytologie en gynécologie. 1965, Londres, 2^e édition.