



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
RABAT



Année: 2020

Thèse N°: 304

LA PONCTION BIOPSIE RENALE TECHNIQUES ANATOMOPATHOLOGIQUES (HISTOLOGIE CONVENTIONNELLE ET TECHNIQUE SPECIALES)

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le : / /2020

PAR

Madame Mariam ZIOUANI
Née le 27 Septembre 1990 à Larachie

Pour l'Obtention du Diplôme de
Docteur en Médecine

Mots Clés : Biopsie rénale; Immunofluorescence ; Microscopie optique; Microscopie électronique ; protéomique.

Membres du Jury :

Madame Nadia CHERRADI

Professeur d'Anatomie Pathologique

Madame Lamiaa ROUAS

Professeur d'Anatomie Pathologique

Monsieur Tarik BOUATTAR

Professeur Agrégé de Néphrologie

Madame Kaoutar ZNATI

Professeur d'Anatomie Pathologique

Madame Bassma EL KHANOUSSI

Professeur d'Anatomie Pathologique

Président

Rapporteur

Juge

Juge

Juge

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا
وَمَا كُنَّا لِنَهْتَدِيَ لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللَّهُ﴾

سورة الأعراف: الآية: 43

بِسْمِ اللَّهِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ
الْعَظِيمِ



UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 - 1969: Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 - 1974: Professeur Abdellatif BERBICH
1974 - 1981: Professeur Bachir LAZRAK
1981 - 1989: Professeur Taieb CHKILI
1989 - 1997: Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 - 2003: Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 - 2013: Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :

<i>Doyen</i>	Professeur Mohamed ADNAOUI
<i>Vice-Doyen chargé des Affaires Académiques et Etudiantes</i>	Professeur Brahim LEKEHAL
<i>Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération</i>	Professeur Toufiq DAKKA
<i>Vice-Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie</i>	Professeur Younes RAHALI
<i>Secrétaire Général</i>	Mr. Mohamed KARRA

* Enseignants Militaires

1 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz Médecine Interne - Clinique Royale
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi Anesthésie - Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif Pathologie Chirurgicale

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed Médecine Interne - Doyen de la FMPR
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. KHARBACH Aïcha Gynécologie - Obstétrique
Pr. TAZI Saoud Anas Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim Anesthésie Réanimation- Doyen de FMPO
Pr. BAYAHIA Rabéa Néphrologie
Pr. BELKOUCHI Abdelkader Chirurgie Générale
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif Chirurgie Générale
Pr. BENSOU DA Yahia Pharmacie galénique
Pr. BERRAHO Amina Ophtalmologie
Pr. BEZAD Rachid Gynécologie Obstétrique Méd. Chef Maternité des Orangers
Pr. CHERRAH Yahia Pharmacologie
Pr. CHOKAIRI Omar Histologie Embryologie
Pr. KHATTAB Mohamed Pédiatrie
Pr. SOULAYMANI Rachida Pharmacologie- Dir. du Centre National PV Rabat
Pr. TAOUFIK Jamal Chimie thérapeutique,

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed Chirurgie Générale Doyen de FMPT
Pr. BENSOU DA Adil Anesthésie Réanimation
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza Gastro-Entérologie
Pr. CHRAIBI Chafiq Gynécologie Obstétrique
Pr. EL OUAHABI Abdessamad Neurochirurgie
Pr. FELLAT Rokaya Cardiologie
Pr. JIDDANE Mohamed Anatomie
Pr. TAGHY Ahmed Chirurgie Générale
Pr. ZOUHDI Mimoun Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine Radiothérapie
Pr. BEN RAIS Nozha Biophysique
Pr. CAOUI Malika Biophysique
Pr. CHRAIBI Abdelmjid Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la FMPA
Pr. EL AMRANI Sabah Gynécologie Obstétrique

* Enseignants Militaires

Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Chirurgie Générale - Directeur du CHIS
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Chirurgie Générale
Gynécologie - Obstétrique
Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie Inspecteur du SSM
Pédiatrie
Traumatologie - Orthopédie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Néphrologie
Cardiologie Directeur HMI Mohammed V

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BIROUK Nazha
Pr. FELLAT Nadia
Pr. KADDOURI Noureddine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Neurologie
Cardiologie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie Directeur Hôp. Ar-razi Salé
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI

Neurologie Doyen de la FMP Abulcassis

* Enseignants Militaires

Pr. BOUGTAB
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*

Abdesslam Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUAMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie Directeur Hôp. My Youssef
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie - Directeur Hôp. Cheikh Zaid
Urologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pédiatrie

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABIRI EL Hassane*

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie - Directeur Hôp. Univ. Cheikh Khalifa
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale Directeur Hôpital Ibn Sina
Chirurgie Thoracique

* Enseignants Militaires

Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBABH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique *V-D chargé Aff Acad. Est.*
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL Fellous Sidi Zouhair
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HAJJI Zakia
Pr. JAAFAR Abdeloihab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RAISS Mohamed
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie *Dir.-Adj. HMI Mohammed V*
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Gynécologie Obstétrique
Oto-Rhino-Laryngologie
Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. HACHI Hafid

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Chirurgie Générale

* Enseignants Militaires

Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre *
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Pédiatrie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Rhumatologie
Ophtalmologie
Rhumatologie *Directeur Hôp. Al Avachi Salé*
Pédiatrie
Cardiologie
Biophysique
Cardiologie (mise en disponibilité)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laïla
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SOUALHI Mouna

Rhumatologie
Hématologie
O.R.L.
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio - Vasculaire. *Directeur Hôpital Ibn Sina Mar*
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie - Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Pneumo - Phtisiologie

* Enseignants Militaires

Pr. TELLAL Saïda*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Biochimie
Pneumo - Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leïla
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
Pr. AMHAJJI Larbi *
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed *
Pr. BALOUCH Lhousaine *
Pr. BENZIANE Hamid *
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHERKAOUI Naoual *
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
Pr. EL BEKKALI Youssef *
Pr. EL ABSI Mohamed
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GHARIB Noureddine
Pr. HADADI Khalid *
Pr. ICHOU Mohamed *
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LOUZI Lhousain *
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed *
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. MRANI Saad *
Pr. OUZZIF Ez zohra *
Pr. RABHI Monsef *
Pr. RADOUANE Bouchaïb*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine *
Pr. SIFAT Hassan *
Pr. TABERKANET Mustafa *
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour *
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie cardio-vasculaire
Chirurgie générale
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologie biologique
Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie-orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali *
Pr. AGADR Aomar *
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *

Médecine interne
Pédiatrie
Chirurgie Générale

* Enseignants Militaires

Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik *
 Pr. DOGHMI Kamal *
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamy
 Pr. LAMSAOURI Jamal *
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Moutassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie *Directeur Hôp.des Spécialités*
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie-orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-Phtisiologie

Anesthésie réanimation
 Médecine Interne *Directeur ERSSM*
 Physiologie
 Microbiologie
 Médecine Aéronautique
 Biochimie- Chimie
 Radiologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Plastique et Réparatrice
 Urologie
 Gastro-Entérologie
 Anatomie Pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale
 Hématologie
 Anatomie Pathologique

* Enseignants Militaires

Decembre 2010

Pr. ZNATI Kaoutar

Anatomie Pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed

Chirurgie pédiatrique

Pr. ABOUELALAA Khalil *

Anesthésie Réanimation

Pr. BENCHEBBA Driss *

Traumatologie-orthopédie

Pr. DRISSI Mohamed *

Anesthésie Réanimation

Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna

Chirurgie Générale

Pr. EL OUAZZANI Hanane *

Pneumophtisiologie

Pr. ER-RAJI Mounir

Chirurgie Pédiatrique

Pr. JAHID Ahmed

Anatomie Pathologique

Pr. RAISSOUNI Maha *

Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir

Pharmacologie

Pr. AIT EL CADI Mina

Toxicologie

Pr. AMRANI HANCHI Laila

Gastro-Entérologie

Pr. AMOR Mourad

Anesthésie Réanimation

Pr. AWAB Almahdi

Anesthésie Réanimation

Pr. BELAYACHI Jihane

Réanimation Médicale

Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain

Anesthésie Réanimation

Pr. BENCHEKROUN Laila

Biochimie-Chimie

Pr. BENKIRANE Souad

Hématologie

Pr. BENNANA Ahmed*

Informatique Pharmaceutique

Pr. BENSghIR Mustapha *

Anesthésie Réanimation

Pr. BENYAHIA Mohammed *

Néphrologie

Pr. BOUATIA Mustapha

Chimie Analytique et Bromatologie

Pr. BOUABID Ahmed Salim*

Traumatologie orthopédie

Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba

Anatomie

Pr. CHAIB Ali *

Cardiologie

Pr. DENDANE Tarek

Réanimation Médicale

Pr. DINI Nouzha *

Pédiatrie

Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali

Anesthésie Réanimation

Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa

Radiologie

Pr. ELFATEMI Nizare

Neuro-chirurgie

Pr. EL GUERROUJ Hasnae

Médecine Nucléaire

Pr. EL HARTI Jaouad

Chimie Thérapeutique

Pr. EL JAOUDI Rachid *

Toxicologie

Pr. EL KABABRI Maria

Pédiatrie

Pr. EL KHANNOUSSI Basma

Anatomie Pathologique

Pr. EL KHLOUFI Samir

Anatomie

Pr. EL KORAIKHI Alae

Anesthésie Réanimation

Pr. EN-NOUALI Hassane *

Radiologie

Pr. ERRGUIG Laila

Physiologie

Pr. FIKRI Meryem

Radiologie

Pr. GHFIR Imade

Médecine Nucléaire

* Enseignants Militaires

Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed *
 Pr. LATIB Rachida
 Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUI Adyl
 Pr. MRABTI Hind
 Pr. NEJJARI Rachid
 Pr. OUBEJJA Houada
 Pr. OUKABLI Mohamed *
 Pr. RAHALI Younes
 Pr. RATBI Ilham
 Pr. RAHMANI Mounia
 Pr. REDA Karim *
 Pr. REGRAGUI Wafa
 Pr. RKAIN Hanan
 Pr. ROSTOM Samira
 Pr. ROUAS Lamiaa
 Pr. ROUIBAA Fedoua *
 Pr. SALIHOUN Mouna
 Pr. SAYAH Rochde
 Pr. SEDDIK Hassan *
 Pr. ZERHOUNI Hicham
 Pr. ZINE Ali *

Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique *Vice-Doyen à la Pharmacie*
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

AVRIL 2013

Pr. EL KHATIB MOHAMED KARIM *

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

MARS 2014

Pr. ACHIR Abdellah
 Pr. BENCHAKROUN Mohammed *
 Pr. BOUCHIKH Mohammed
 Pr. EL KABBAJ Driss *
 Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira *
 Pr. HARDIZI Houyam
 Pr. HASSANI Amale *
 Pr. HERRAK Laila
 Pr. JANANE Abdellah *
 Pr. JEAIDI Anass *
 Pr. KOUACH Jaouad*
 Pr. LEMNOUER Abdelhay*
 Pr. MAKRAM Sanaa *
 Pr. OULAHYANE Rachid*
 Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar
 Pr. SEKKACH Youssef*
 Pr. TAZI MOUKHA Zakia

Chirurgie Thoracique
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Thoracique
 Néphrologie
 Biochimie-Chimie
 Histologie- Embryologie-Cytogénétique
 Pédiatrie
 Pneumologie
 Urologie
 Hématologie Biologique
 Gynécologie-Obstétrique
 Microbiologie
 Pharmacologie
 Chirurgie Pédiatrique
 CCV
 Médecine Interne
 Gynécologie-Obstétrique

* Enseignants Militaires

DECEMBRE 2014

Pr. ABILKACEM Rachid*	Pédiatrie
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila	Médecine Légale
Pr. BEKKALI Hicham *	Anesthésie-Réanimation
Pr. BENAZZOU Salma	Chirurgie Maxillo-Faciale
Pr. BOUABDELLAH Mounya	Biochimie-Chimie
Pr. BOUCHRIK Mourad*	Parasitologie
Pr. DERRAJI Soufiane*	Pharmacie Clinique
Pr. DOBLALI Taoufik	Microbiologie
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali	Anatomie
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim*	Anesthésie-Réanimation
Pr. EL MARJANY Mohammed*	Radiothérapie
Pr. FEJJAL Nawfal	Chirurgie Réparatrice et Plastique
Pr. JAHIDI Mohamed*	O.R.L
Pr. LAKHAL Zouhair*	Cardiologie
Pr. OUDGHIRI NEZHA	Anesthésie-Réanimation
Pr. RAMI Mohamed	Chirurgie Pédiatrique
Pr. SABIR Maria	Psychiatrie
Pr. SBAI IDRISSE Karim*	Médecine préventive, santé publique et Hyg.

AOÛT 2015

Pr. MEZIANE Meryem	Dermatologie
Pr. TAHIRI Latifa	Rhumatologie

PROFESSEURS AGREGES :

JANVIER 2016

Pr. BENKABBOU Amine	Chirurgie Générale
Pr. EL ASRI Fouad*	Ophthalmologie
Pr. ERRAMI Nouredine*	O.R.L
Pr. NITASSI Sophia	O.R.L

JUIN 2017

Pr. ABBI Rachid*	Microbiologie
Pr. ASFALOU Ilyasse*	Cardiologie
Pr. BOUAYTI El Arbi*	Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pr. BOUTAYEB Saber	Oncologie Médicale
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim	Oncologie Médicale
Pr. HAFIDI Jawad	Anatomie
Pr. OURAINI Saloua*	O.R.L
Pr. RAZINE Rachid	Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pr. ZRARA Abdelhamid*	Immunologie

NOVEMBRE 2018

Pr. AMELLAL Mina	Anatomie
Pr. SOULY Karim	Microbiologie
Pr. TAHRI Rajae	Histologie-Embryologie-Cytogénétique

* Enseignants Militaires

NOVEMBRE 2019

Pr. AATIF Taoufiq *
Pr. ACHBOUK Abdelhafid *
Pr. ANDALOUSSI SAGHIR Khalid *
Pr. BABA HABIB Moulay Abdellah *
Pr. BASSIR RIDA ALLAH
Pr. BOUATTAR TARIK
Pr. BOUFETTAL MONSEF
Pr. BOUCHENTOUF Sidi Mohammed *
Pr. BOUZELMAT Hicham *
Pr. BOUKHRIS Jalal *
Pr. CHAFRY Bouchaïb *
Pr. CHAHDI Hafsa *
Pr. CHERIF EL ASRI Abad *
Pr. DAMIRI Amal *
Pr. DOGHMI Nawfal *
Pr. ELALAOUI Sidi-Yassir
Pr. EL ANNAZ Hicham *
Pr. EL HASSANI Moulay EL Mehdi *
Pr. EL HJOUJI Aabderrahman *
Pr. EL KAOUI Hakim *
Pr. EL WALI Abderrahman *
Pr. EN-NAFAA Issam *
Pr. HAMAMA Jalal *
Pr. HEMMAOUI Bouchaïb *
Pr. HJIRA Naoufal *
Pr. JIRA Mohamed *
Pr. JNIE NE Asmaa
Pr. LARAQUI Hicham *
Pr. MAHFOUD Tarik *
Pr. MEZIANE Mohammed *
Pr. MOUTAKI ALLAH Younes *
Pr. MOUZARI Yassine *
Pr. NAOUI Hafida *
Pr. OBTEL Majdouline
Pr. OURRAI Abdelhakim *
Pr. SAOUAB Rachida *
Pr. SBITTI Yassir *
Pr. ZADDOUG Omar *
Pr. ZIDOUH Saad *

Néphrologie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
Radiothérapie
Gynécologie-obstétrique
Anatomie
Néphrologie
Anatomie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Traumatologie-orthopédie
Traumatologie-orthopédie
Anatomie Pathologique
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Anesthésie-réanimation
Pharmacie Galénique
Virologie
Gynécologie-obstétrique
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Anesthésie-réanimation
Radiologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
O.R.L
Dermatologie
Médecine Interne
Physiologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Anesthésie-réanimation
Chirurgie Cardio-vasculaire
Ophtalmologie
Parasitologie-Mycologie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pédiatrie
Radiologie
Oncologie Médicale
Traumatologie Orthopédie
Anesthésie-réanimation

* Enseignants Militaires

2 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS/Prs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie-chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr .BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie-chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. YAGOUBI Maamar	Environnement,Eau et Hygiène
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

Mise à jour le 11/06/2020

KHALED Abdellah

Chef du Service des Ressources Humaines

FMPR

* *Enseignants Militaires*



DEDICACES

Je dédie cette thèse :

A mes parents

Je vous dédie ce travail, qui n'est en réalité que le fruit de vos encouragements et l'aboutissement de vos grands sacrifices.

Vous avez su le long de mon parcours m'épauler, me guides et vous n'avez pas cessé un seul instant d'attirer le feu de ma volonté.

Vous avez su me transmettre le courage et la bonté de vos grands cœurs et j'aimerais vous transmettre à mon tour le bonheur d'un rêve qui se réalise et l'ambition d'être à la hauteur de vos attentes.

Que dieu vous préserve en bonne santé et vous bonne longue vie.

A mon frère SI Mohammed

J'espère que vous trouverez ici l'expression de mon amour et de mon attachement. Je vous souhaite, bonne santé, pleins de succès et de bonheur.

A ma sœur imane et ses deux perles Zainab et Israa

Je vous dédie ce modeste travail en témoignage de mon amour et de mon attachement, Je vous souhaite bonne santé et beaucoup de bonheur.

A tous mes amies

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide.



REMERCIEMENTS

A notre maitre et présidente de thèse

Madame le professeur CHERRADI Nadia

Professeur d'anatomopathologie

La précision de votre pensée et votre compétence sont connues de tous vos collègues la puissance de synthèse de votre esprit et la sagesse que vous confère votre expérience fait de vous le maitre que l'on écoute et que l'on respecte.

A notre Maitre et rapporteur de thèse

Madame le professeur ROUAS Lamiaa

Professeur d'anatomopathologie

La passion de votre métier que vous transmettez et la simplicité de votre accueil vous font aimer de tous : et par les conseils habiles et précieux que vous nous avez prodigués avec gentillesse dans la réalisation de ce travail

Nous sommes fiers de compter parmi vos élèves et nous espérons être dignes de votre confiance.

A notre maitre et juge de thèse

Madame le professeur EL KHANNOUSSI Basma

Professeur d'anatomopathologie

*Votre honnêteté et votre dynamisme ainsi que votre efficacité sont un
enseignement précieux et un exemple pour nous*

Soyez assuré de notre fidèle attachement

A notre maitre et juge de thèse

Monsieur le professeur BOUATTAR Tarik

Professeur agrégé en néphrologie

Vous avez très aimablement accepté de siéger au jury de notre thèse

Votre sympathie à notre égard nous a profondément marqué

Veillez trouver ici, l'expression de notre grande estime et notre sincère

gratitude

A notre maitre et juge de thèse

Madame le professeur ZNATI Kaoutar

Professeur d'anatomopathologie

Votre compétence, la clarté de votre raisonnement nous ont séduits

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger parmi notre

jury de thèse

Veillez trouver ici, madame l'assurance de notre respectueuse

reconnaissance



***LISTE
DES ABREVIATIONS***

Liste des abréviations

ABMR	: Rejet aigu médié par anticorps
AFA	: Alcool formol acétique
CAKUT	: Anomalie congénitale du rein et du tractus urinaire.
CGH	: Hybridation génomique comparative
CPA	: Cellule présentatrice d'antigène
CTLA-4	: Cytotoxique-lymphocytes associated-4
DPG	: Dysfonction précoce du greffon
DSA	: Anticorps spécifique au donneur
FFPE	: Fixé et inclus en paraffine
FIR	: fibrose interstitiel rénal.
FSGS	: Glomérulosclérose segmentaire focale
FTIR	: Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GNA	: Glomérulonéphrite aigue
GN	: Glomérulonéphrite
GP	: Glomérulopathie
GFP	: Protéine fluorescente verte
GS	: Glomérulosclérose
HE	: Hématoxyline éosine
HPLC	: Chromatographie en phase liquide haute performance
IF	: Immunofluorescence
IHC	: Immuno-histochimie
IP	: Immuno-péroxydase

IR	: Insuffisance rénale
MBG	: Membrane basale glomérulaire
ME	: Microscope électronique
MET	: Microscope électronique à transmission
MO	: Microscope optique
MSMS	: Spectrométrie de masse en Tandem
NEP	: Endopeptidase neutre
NGS	: Séquençage de nouvelle génération
NP	: Néphropathie
PAS	: Périodic-Acid-Schiff
PBR	: Ponction biopsie rénale
PCR	: Polymérase chaîne réaction
PEC	: Cellule épithéliale pariétal
RRD	: Reprise retardée de fonction
SR	: Spectroscopie Raman
SA	: Syndrome d'Alport



***LISTE
DES ILLUSTRATIONS***

Liste des figures

Figure 1: Pistolet automatique (Bard® Biopty®)	4
Figure 2: Système coupant « Quick-core » utilisé lors des biopsies rénales transveineuses. Gaine Arrows® (A). Cathéter de protection (B). Aiguille de biopsie « Quick-core » (C)	5
Figure 3: Morphologie externe du rein droit.	10
Figure 4: Morphologie interne du rein	11
Figure 5: Vascularisation rénale	13
Figure 6: Schéma du néphron	17
Figure 7: Schéma du glomérule	18
Figure 8: Coupe schématique d'un lobule glomérulaire	19
Figure 9: Tube proximal et distal du rein normal. MO ; coloration H&E	25
Figure 10: Une cellule du Tube contourné proximal	26
Figure 11: Tube contourné distal ; MO, Trichrome bleu	27
Figure 12: Tube collecteur rénal , MO, Coloration argentique	28
Figure 13: L'appareil juxta-glomérulaire	29
Figure 14: Microscope optique binoculaire	39
Figure 15: Une loupe à manche	39
Figure 16: Microscope à dissection	39
Figure 17: Fragment de biopsie rénale sur lame de verre avec une solution saline	40
Figure 18: Glomérule à l'état frais vu par un microscope à dissection	40
Figure 19: Glomérule à l'état frais vu avec une loupe	41
Figure 20: Diagramme pour illustrer la division des fragments de biopsie rénale en l'absence d'un microscope à dissection pour les laboratoires utilisant l'immunofluorescence et la ME	42
Figure 21: Stratégie top-down et bottom-up. La stratégie top-down part de la protéine intacte pour arriver aux fragments peptidiques. La stratégie bottom-up part quant à elle aux peptides pour arriver aux protéines	58
Figure 22: les étapes d'analyse d'ADN par la technique de Microarrays (Puce à ADN)	63

Figure 23: un échantillon imagé puis re-imagés après rotation de la scène. 3A a tourné à 45 degrés et 3b a tourné à 60 degrés. La biréfringence verte n'est plus visible comme indiqué par les flèches 73

Figure 24:Évaluation aux ultraviolets (UV) de la glomérulopathie amyloïde spontanée (A et B) à fort grossissement (filtres Texas rouges) 73

Figure 25: L' étude des sous-classes d' Ig G est utile pour différencier la GN extra-membraneuse primaire (généralement avec des dépôts de sous-type IgG4) (A-D) de la GN extra-membraneuse secondaire (généralement avec des dépôts dominants d' IgG1) (E-H). IgG1 (A et E), IgG2 (B et F), IgG3 (C et G), IgG4 (D et H) 84

Figure 26: l'étude en IF des sous-classes d' IgG est nécessaire pour le diagnostic de la glomérulonéphrite à dépôts d'immunoglobulines monotypiques: IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C), IgG4 (D). La monoclonalité des dépôts d'Ig G ne peut pas toujours être déterminée par l'étude des chaînes kappa et lambda si des dépôts d'immunoglobulines non IgG concomitants (tels que les IgM, qui sont souvent non spécifiques) sont présents. E-G, même cas que A-D : IgM (E), kappa (F), lambda (G)..... 84

Figure 27: Immunohistochimie DNAJB9 au cours de la de glomérulonéphrite fibrillaire (FGN) . (a, b) L'immunohistochimie montre une forte coloration glomérulaire pour le DNAJB9 dans 2 cas différents de GN fibrillaire. (c) Les glomérules normaux et l' amylose à chaîne légère κ ne présentent pas de fixation avec le DNAJB9. (a, Grossissement d'origine $\times 20$; b – d, grossissement d'origine $\times 200$.)..... 86

Figure 28: Dépôts extraglomérulaires de DNAJB9 dans la glomérulonéphrite fibrillaire (GNF). (a) Marquage focale des membranes basales tubulaires (flèches) au marquage glomérulaire. (b) Dépôts dans la paroi d'une artériole (flèche). (c) Dépôts dans la paroi des artérioles spléniques. (d) Immunofluorescence : dépôts linéaires des membranes basales tubulaires avec l'Ig G. (e) Immunofluorescence : dépôts dans une artériole (flèche) avec l'IgG. (f) Les artérioles spléniques du même cas qu'en (c) présentent des dépôts d'IgG en immunofluorescence (flèches). (a – e, Grossissement original $\times 400$; f, grossissement original $\times 200$ 87

Figure 29: Microscopie électronique. L'effacement des pédicelles des podocytes de (l'épithélium viscéral) d'une boucle capillaire glomérulaire au cours d'une maladie glomérulaire minime. $\times 7000$.. 95

Figure 30: Microscopie électronique. Le syndrome d'Alport. Une lamellation de la membrane basale glomérulaire est caractéristique. $\times 19\ 000$ 96

Figure 31: Microscopie électronique. La membrane basale glomérulaire vue par microscope électronique, d'un garçon de 10 ans atteint du syndrome d'Alport lié à l'X. montre une alternance

d'épaisseur de MBG, épaisse et fendue (doubles flèches) et minces (flèche simple). (Acétate d'uranyle-citrate de plomb, × 13 200.)	96
Figure 32: Microscopie électronique. Un patient de sexe masculin âgé de 26 ans atteint du syndrome d'Alport lié à l'X qui a développé une IRT à l'âge de 37 ans. Notez l'atténuation généralisée de la MBG. (Coloration à l'argent méthénamine × 2500.)	97
Figure 33: Microscopie électronique, Glomérulopathie immunotactôïde. Agrégat de fibrilles microtubulaires dans la membrane basale glomérulaire x 59 000.	98
Figure 34: Microscopie électronique Lupus érythémateux disséminé. (A) L'épaississement de la membrane basale glomérulaire d'un boucle capillaire avec des dépôts sous-endothéliaux denses en électrons. Les cellules endothéliales présentent des inclusions tubulo-réticulaires (flèches).x7100	99
Figure 35: ME. La glomérulonéphrite post-infectieuse,. Une boucle capillaire glomérulaire qui présente des dépôts denses aux électrons "humps" (*) à la jonction entre le mésangium et la membrane basale glomérulaire. x7300	100
Figure 36: ME. Epaississement de la membrane basale glomérulaire, au cours d'un diabète sucré .	101
Figure 37: Microscopie électronique, Amylose. Des brins d'amyloïde disposés au hasard et non ramifiés dans la membrane basale glomérulaire.x 69 000	102
Figure 38: Microscopie électronique, Altérations mésangiocapillaires dans une boucle capillaire glomérulaire d'un patient atteint d'hépatite C. Deux couches de membrane basale glomérulaire sont présentes (flèches) avec interposition de cytoplasme entre elles. Les dépôts denses en électrons (*) x7500	103
Figure 39: les étapes de typage des amyloses par protéomique	105

Liste des tableaux

Tableau I : Les trois domaines des podocytes et leurs protéines, rôle dans la fonction et la forme du podocyte.	22
Tableau II : Les avantages et les inconvénients des deux techniques d'immunohistochimie (l'IF et l'IP).	52
Tableau III : Caractéristiques tinctoriales des structures normales et anormales du rein, sur des coupes provenant des fragments fixés et inclus en paraffine.	69
Tableau IV : Comparaison de l'apport des 4 principales colorations systématiques à l'analyse des structures du parenchyme rénal normal et pathologique.....	70
Tableau V : Chaîne du collagène IV et membranes basales glomérulaires (MBG)	81
Tableau VI : avantages et inconvénients des deux technique protéomique et immunomarquage utilisé pour le typage de l'amylose	104

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	2
II. BIOPSIE RENALE	4
1- Technique de biopsie rénale	4
a- Biopsie rénale percutanée	4
b-Biopsie rénale transveineuse	5
c-Biopsie rénale par voie chirurgicale	6
2. Indications de biopsie rénale	6
III. RAPPELS	9
1- MACROSCOPIE DU REIN	9
2. Microscopie du rein normal	14
a- Organisation architecturale	14
b- Néphron	15
c- Glomérule	16
d- Le tube rénal	24
e- Appareil juxta-glomérulaire du rein	28
f- Interstitium	30
IV. CLASSIFICATION DES MALADIES RENALES	31
1-maladies glomérulaires	32
2- Maladies vasculaires rénales	32
3- Néphropathies particulières	33
4- Maladies tubulaires et interstitielles	33
5- Maladies héréditaires	34
6-Pathologie de la transplantation	34
7-AUTRE	34

V. TECHNIQUES D'ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE DES BIOPSIES RENALES36

1. Examen macroscopique de la biopsie rénale et acheminement au laboratoire d'anatomie pathologique	37
2- Microscope optique	43
a- Préparation du prélèvement	43
a-1 Fixation	43
a-2 Déshydratation	44
a-3 Inclusion en paraffine	44
a-4 Coupes	44
a-5 Colorations	45
3 - Immunohistochimie	49
3-1 Immunofluorescence	49
a- Préparation du prélèvement	49
3-2 Techniques immuno-enzymatiques : immunopéroxydase (IP).....	51
a- Préparation du matériel	51
4. Microscopie électronique	52
a- Préparation du prélèvement	52
1. Fixation	52
2. Coupe	53
3. Coloration par le bleu de toluidine pour sélectionner les zones d'intérêt.....	53
4. Coupes ultrafines à l'ultra microtome de 80 nm, déposées sur des grilles métalliques.....	53
5. Coloration avec l'acétate d'uranyle ou sels de plombs.....	53
6. Lecture au microscope électronique.	53
b- Examen ultrastructurale	53
c- Indications de la MET	53

d- Les contraintes	54
VI. TECHNIQUES NON MORPHOLOGIQUES	56
A. Spectroscopie vibrationnelle	56
a- Spectroscopie RAMAN	56
a.1- Principe	56
b- La spectroscopie infrarouge	57
b.1- Principe	57
B. Spectrométrie de masse	57
a. Généralités	57
b. Indication de la spectrométrie de masse en pathologie rénale	59
C. Biologie moléculaire	59
1. Réaction en chaîne par polymérase PCR	59
1. a. PCR classique/ conventionnelle	59
1. b. PCR en temps réel ou quantitative	60
1. c. Reverse transcriptase RT-PCR in situ	61
1. d. Indications en pathologie rénal	61
2. Microarrays / Puces à ADN	62
a. Principe	62
b. Indication en pathologie rénale de la technique microarrays /puces à ADN	64
3. Séquençage de nouvelle génération (NGS)	65
a. Principe	65
b. Applications en pathologie rénale	66
VII. LECTURE DES LAMES	68
1. Microscopie optique	68
2. Immunofluorescence	74

2-1 Les lésions fluorescentes non significatives	76
2-2 Les lésions fluorescentes mais non spécifiques	76
2-3 Les Lésions fluorescentes évocatrices d'une glomérulopathie	76
2.4. Autres marqueurs utilisés en IF	79
3. Marqueurs mis en évidence par immunohistochimie/technique à l'immunopéroxydase.....	85
4. Microscopie électronique	94
4 -a Les aspects spécifiques en ME	95
4 -b. Pathologies diagnostiquées par d'autres techniques et confirmées par la ME	98
5- Techniques non morphologiques	103
a- Technique	105
b- Indication du typage d'amylose par protéomique	106
CONCLUSION	107
RESUMES	109
ANNEXE	113
REFERENCES	136



INTRODUCTION

I. INTRODUCTION :

La biopsie rénale est une technique qui consiste à prélever un échantillon de tissu rénal à l'aide d'une aiguille ou au cours d'une intervention chirurgicale.

L'échantillon prélevé va être soumis à différents tests et colorations, et ensuite examiné au microscope afin de préciser le type histologique des lésions rénales et donc poser le diagnostic positif et nous orienter vers un traitement spécifique.

L'étude anatomopathologiques de l'échantillon permet de préciser la classification nosologique des néphropathies en particulier glomérulaires, les signes d'activités et de gravités et donc d'apprécier le pronostic de la maladie.

L'analyse histologique du prélèvement permet également de comprendre le mécanisme pathogénique de la maladie.

Dans ce document, nous allons revoir les indications de la biopsie rénale, ses aspects pratiques, les rappels histologiques et les modalités techniques utilisés en néphropathologie (techniques usuelles et les nouvelles techniques).



BIOPSIE RENALE

II. BIOPSIE RENALE :

1- Technique de biopsie rénale : [1]

a- Biopsie rénale percutanée :

C'est la méthode de biopsie rénale la plus utilisée et la plus ancienne.

Le patient est placé en décubitus ventral sur un plan dur et sur un oreiller roule comprimant l'abdomen et fixant le rein.

La biopsie intéresse Le pôle inférieur du rein gauche, car c'est la partie la moins mobile. Et on diminue ainsi le risque de perforation de la veine cave inférieure.

Une anesthésie locale a la Xylocaine des différents plans cutanéomusculoaponévrotique sur le trajet de la ponction.

En utilisant un pistolet automatique (à usage unique), permet de prélever une carotte d'environ 1cm x 1 mm, renferment généralement 5 à 30 glomérules.

Calibre de l'aiguille = 14 gauge

Après la ponction le patient est mis sous surveillance pendant 24h.

Conseiller le malade de rester en décubitus dorsal surtout les premières 24h.

Conseiller le malade de réduire ses activités physiques pendant 8 à 15 jours.



Figure 1: Pistolet automatique (Bard® Biopty®) [1]

b-Biopsie rénale transveineuse :

C'est une technique alternative de biopsie rénale, réservée aux patients présentant des contre-indications à la biopsie rénale percutanée conventionnelle (patient sous traitement anticoagulant, ou qui présente une coagulopathie non corrigible).

Elle utilise les vaisseaux natifs comme voie d'accès au parenchyme rénal : veine jugulaire interne → veine cave → veine rénale droite.

L'échantillon obtenu est de petite taille constitué principalement de médullaire, (difficile à techniquer) ce qui diminue le rendement diagnostique

Actuellement deux techniques sont utilisées :

- La PBR transjugulaire utilisant un système d'aspiration de type **colapinto modifié**
- Récemment, le système coupant « **Quick-core** »

Le système colapinto modifié rapporte moins de complication majeure par rapport aux autres techniques.

Le système coupant « Quick-core » présente un diamètre moins important permettant une cathétérisation plus profonde, sans fragmentation excessive des tissus

Elle s'accompagne d'un taux de complication plus important, telle que la perforation capsulaire, d'où la nécessité d'un contrôle radiologique systématique lors de l'intervention et l'embolisation sélective en cas d'extravasation de produit de contraste après perforation.

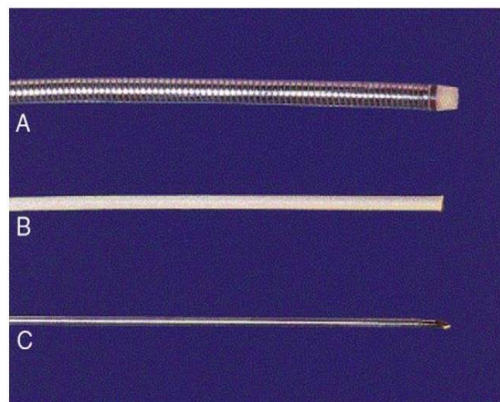


Figure 2: Système coupant « Quick-core » utilisé lors des biopsies rénales transveineuses. GaineArrows® (A).Cathéterdeprotection(B).Aiguille de biopsie « Quick-core » (C)[2].

c-Biopsie rénale par voie chirurgicale :

Il existe deux techniques chirurgicales : la biopsie rénale « à ciel ouvert » et par laparoscopie.

Elles sont réservées aux patients présentant des contre indications à la biopsie rénale par voie percutanée.

Elle permet le contrôle visuel de l'hémostase.

Elles nécessitent une anesthésie générale (évalué le risque).

2. Indications de biopsie rénale :

➤ Rein natif :

• SYNDROME NÉPHROTIQUE:

- Les enfants entre un an et l'âge de la puberté
- Les diabétiques, avec une longue antériorité du diabète, et une majoration progressive du débit de la protéinurie

• SYNDROME DE GNA et /ou GNRP

• MALADIES SYSTÉMIQUES ASSOCIÉES À UNE PROTÉINURIE OU UNE INSUFFISANCE RÉNALE

• INSUFFISANCE RÉNALE AIGUE:

- Absence de cause reconnue
- Rapport albuminurie/créatinine urinaire supérieur à 30 mg/g en faveur d'une atteinte glomérulaire
- Hématurie significative
- Oligurie prolongée

• PROTÉINURIE D'ORDRE NON NÉPHROTIQUE

• HÉMATURIE ISOLÉE : après élimination des causes urologiques

• INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE INEXPLIQUÉE :

- Particulièrement si l'IR s'aggrave de façon accélérée

- Mise en évidence des lésions justifiant un traitement spécifique (prolifération extracapillaire surajoutée, embolies de cholestérol, néphropathie interstitielle)
- Il peut être également important qu'un diagnostic méconnu soit fait même à un stade avancé de l'IR en vue d'une éventuelle transplantation rénale, ce qui influencera la surveillance et la prise en charge postgreffe

En présence d'une insuffisance rénale chronique à petits reins, la PBR est contre indiqué.

➤ **Greffon rénal**

- **Suspicion de rejet aigu « DPG / RRD »**
- **Syndrome glomérulaire**
- **Insuffisance rénale aigue d'origine inexpliquée**
- **Aggravation inexpliquée de la fonction rénale.**
- **Non réponse à un traitement anti-rejet**
- **Biopsie systématique « protocolaire »**

Toutes ces indications ne sont pas absolues. Dans chaque situation, si des investigations cliniques et de laboratoires associées suggèrent un schéma histologique prévisible, une biopsie du rein peut ne pas être nécessaire.

Voici les contre-indications de la biopsie rénale:

Absolues :

1. Petits reins
2. Coagulopathie anormale
3. Hypertension incontrôlée.

Relatives :

1. Rein solitaire
2. Patient non coopératif
3. Impossible de se coucher à plat sur le lit



RAPPELS

III. RAPPELS :

1- MACROSCOPIE DU REIN: [2,3]

- **Morphologie externe :**

Les reins sont au nombre de deux. Leur forme est comparable à celle d'un haricot à deux faces lisses, antérieure et postérieure et à deux bords l'un externe convexe et l'autre interne concave.

Ils ont deux extrémités, l'une supérieure et l'autre inférieure. Les deux reins sont appliqués sur la paroi abdominale postérieure, en arrière du péritoine, l'un à droite, l'autre à gauche de la colonne vertébrale. Chaque rein est orienté obliquement en bas et latéralement. Le rein présente une échancrure au niveau du hile où pénètre l'artère rénale et naît la veine rénale et le bassinet. Sa couleur est rouge brun, avec une consistance ferme mais très différente chez le sujet vivant par rapport au cadavre. En effet la tension interne liée à la richesse vasculaire et à l'urine donne une consistance plus tendue et moins friable à l'organe.

- **Dimensions :**

Leurs dimensions moyennes sont : 12 cm de hauteur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur. Le hile rénal a une hauteur de 3 cm et une épaisseur de 1,5 cm (Fig. 3).

Chaque rein pèse environ 140 grammes chez l'homme et 125 grammes chez la femme.

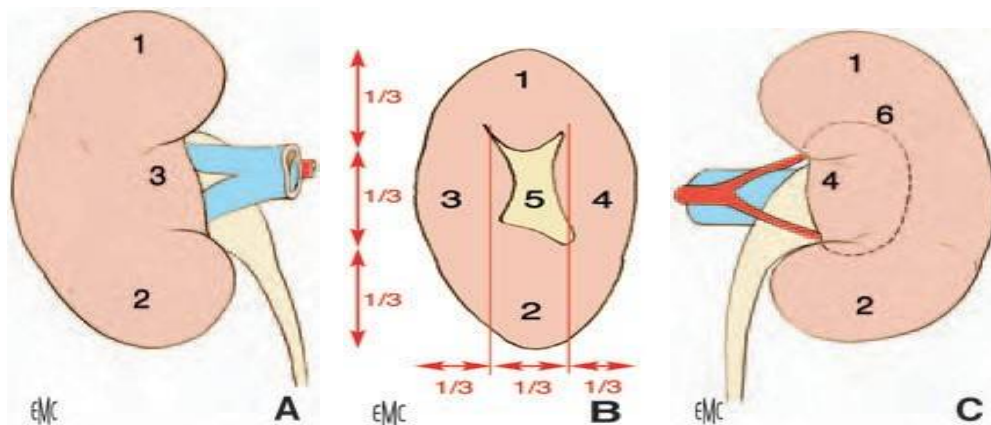


Figure 3: Morphologie externe du rein droit.[2]

- A. Face antérieure.
- B. Bord médial avec le hile rénal.
- C. Face postérieure, avec projection des limites du sinus rénal. 1. Pôle supérieur ; 2. pôle inférieur ; 3. lèvres antérieure du hile ; 4. lèvre postérieure du hile ; 5. hile ; 6. projection du sinus rénal.

• **Morphologie interne :**

Les reins sont recouverts d'une capsule fibreuse, facilement clivable, et se continue au niveau du hile avec le tissu conjonctif entourant les calices et le bassinet.

Il existe deux zones distinctes dans le rein :

- La corticale externe de couleur brun foncé de 1 cm d'épaisseur
- La médullaire interne plus «pâle »

Le cortex rénal correspond à une bande continue de tissu pâle, entourant complètement la médullaire rénale. Des extensions du cortex rénal « les colonnes de Bertin » se projettent au centre du rein, divisant la médullaire en agrégats triangulaires discontinus de tissu « les pyramides de Malpighi ».

Les rayons médullaires ou « pyramides de Ferrein » s'étendent vers le cortex qui les entoure, le parenchyme rénal situé entre ces rayons forme le labyrinthe.

Chaque pyramide rénale avec la zone de cortex rénal qui l'entoure et le prolonge jusqu'à la capsule rénale, forme un lobe rénal. Il existe 11 à 14 lobes par rein normal.

Les sommets des pyramides de Malpighi sont orientés vers le centre, en direction du sinus rénal. Leurs projections apicales « papilles rénales » sont entourées par les petits calices. Les petits calices reçoivent l'urine et représentent les parties proximales du tube qui va former par la suite l'uretère. Au sein du sinus rénal, plusieurs petits calices se réunissent pour former un grand calice, et deux à trois grands calices se réunissent pour former le pelvis rénal « pyélon ou bassinnet » qui a une forme d'entonnoir et correspond à l'extrémité proximale de l'uretère.

Le hile du rein est situé sur le bord médian du rein. Il correspond à une fente verticale profonde, à travers laquelle les vaisseaux, les nerfs et les lymphatiques pénètrent et quittent le rein. En profondeur, le hile est en continuité avec le sinus rénal.

Le sinus rénal est un espace cellulo-graisseux entré par le parenchyme rénal. Il englobe les cavités et les tiges calicielles et se continue vers le hile rénal en englobant les vaisseaux rénaux, et lymphatiques

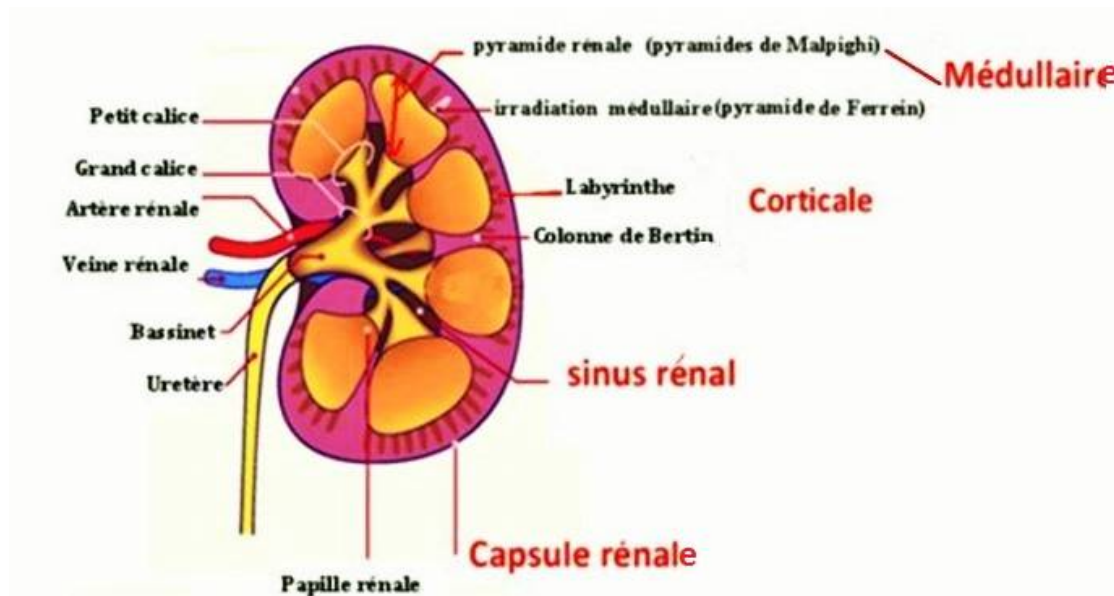


Figure 4: Morphologie interne du rein [2].

- **VASCULARISATION RENALE :[3]**

- **ARTÈRES :**

Le rein reçoit **25%** du débit cardiaque

La vascularisation rénale artérielle est de type terminal.

L'artère rénale provient de l'aorte abdominale. Dans le hile rénal, elle se divise en **branches segmentaires antérieure et postérieure.**

Chaque artère segmentaire donne naissance à plusieurs **artères interlobaires** qui cheminent entre les pyramides jusqu'à leur base. A ce niveau, elles donnent **des artères arquées** à la jonction médullaire-cortex.

Les artères arquées donnent naissance aux **artères interlobulaires** qui cheminent au centre du labyrinthe vers le cortex, en donnant **les artérioles afférentes** des glomérules.

L'artériole afférente forme un réseau de capillaires organisé « flocculus ». Ces capillaires se rejoignent ensuite pour former **l'artériole efférente.**

Les artérioles efférentes vont donner naissance au **réseau capillaire péri-tubulaire** et au **vasa recta** qui vont se drainer dans les veines interlobulaires, arquées et interlobaires (Fig.5).

- **DRAINAGE VEINEUX :**

Le sang provenant du réseau des capillaires péri-tubulaires et du vasa recta se draine successivement dans les **veines inter-lobulaires, arquées et interlobaires.**

Ces veines interlobaires, à trajet parallèle aux artères, sont ensuite à l'origine **des veines intra-rénales** puis de la **veine rénale.**

Contrairement aux artères, les veines rénales sont largement anastomosées.

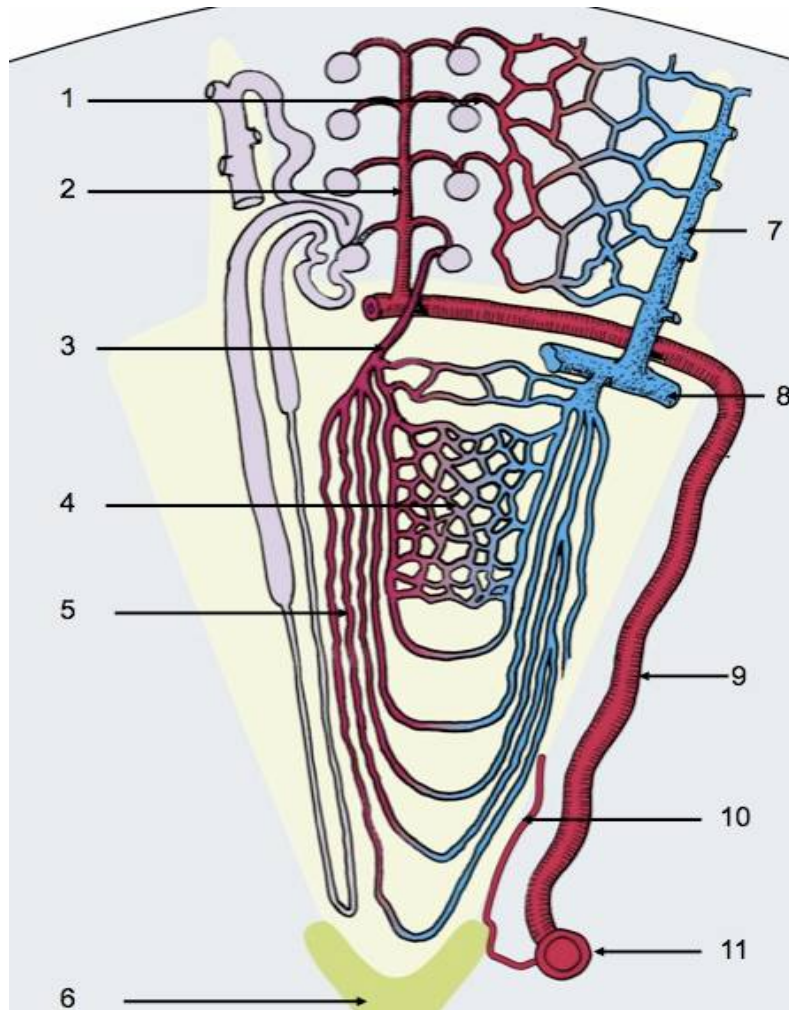


Figure 5:Vascularisation rénale[3].

1. Artériole efférente glomérulaire d'un glomérule superficiel
2. Artère inter lobulaire
3. Artériole efférente d'un glomérule profond
4. Réseau capillaire médullaire
5. vasa recta
6. Calice
7. Veine inter lobulaire
8. Veine arquée
9. Artère arquée
10. Rameau artériel irrigant la partie inférieure de la papille
11. Artère inter lobaire.

- **LYMPHATIQUES :**

Le réseau des lymphatiques suit le réseau vasculaire. Il est constitué d'un réseau superficiel cortical sous capsulaire et d'un réseau profond prenant naissance dans l'adventice des artères inter lobulaires.

Les vaisseaux collecteurs émergent ensuite dans le hile rénal et se rendent dans les ganglions lymphatiques hilaires puis para-aortiques

Il n'existe pas de vaisseaux lymphatiques péri glomérulaires, ni péri tubulaires.

- **NERFS :**

L'innervation rénale est assurée par le plexus rénal qui a pour origine:

- Les ganglions cœliaques
- Les ganglions mésentériques supérieurs
- Les ganglions aortico-rénaux
- Le nerf petit splanchnique

Les rameaux nerveux se disposent en deux plans ; antérieur et postérieur

2. Microscopie du rein normal :[3,4]

a- Organisation architecturale :

Le cortex est formé de 2 constituants :

- **Le labyrinthe** : qui renferme les glomérules, la partie contournée des tubes proximaux et distaux et la portion initiale des tubes collecteurs.

- **Le rayon médullaire** :

- Il correspond à une projection de la médullaire dans le cortex.
- Il est composé de segments tubulaires perpendiculaires à la jonction cortico-médullaire.

- Ces segments tubulaires sont représentés par : les tubes collecteurs et la parties droites des tubes proximaux et distaux.

La médullaire est formée par deux zones interne et externe

- La médullaire externe comprend deux couches :
 - **Une couche externe** où on retrouve les collecteurs et les portions droites des tubes proximaux, et la portion épaisse ascendante de l'anse de Henlé.
 - **Une couche interne** où cheminent la portion fine descendante et épaisse ascendante des anses de Henlé et les tubes collecteurs.
- La médullaire interne où cheminent les portions fines ascendante et descendante de l'anse de Henlé et les tubes collecteurs de Bellini. **(Fig.5)**

b- Néphron :

- Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein.
- Il existe environ un million de néphron par rein.
- Il dérive du blastème métanéphrogène.
- Chaque néphron est constitué d'un glomérule et d'un tube rénal
- Le tube rénal est fait d'un tube proximal, d'une anse Henlé et d'un tube distal
- Les glomérules situés dans le cortex superficiel et moyen ont une anse Henlé courte.
- Les glomérules proches de la jonction cortico médullaire ont une anse Henlé longue atteignant la médullaire interne.
- La partie distale du tube rénal se draine dans les canaux collecteurs qui dérivent du bourgeon urétéral.
- Les cellules souches du rein sont retrouvées à trois niveaux : la papille rénale, les tubes proximaux et la couche pariétale du glomérule. Elles peuvent être identifiées par des marqueurs comme le CD24 et le CD133.

c- Glomérule :

Le corpuscule de Malpighi comporte le glomérule (vasculaire) et les deux feuillets viscéral et pariétal de la capsule de Bowman limitant autour du glomérule la chambre de filtration contenant l'urine primitive qui s'écoule par le pôle urinaire vers le tube contourné proximal. **(Fig.6)**

Chez l'adulte, le glomérule mesure 200 μ m de diamètre.

L'artériole glomérulaire afférente aborde le glomérule par son pôle vasculaire et se résout en 5 ou 6 artérioles qui donnent naissance à une vingtaine d'anses capillaires anastomosées constituant un lobule.

Ceux-ci sont finalement repris par l'artériole glomérulaire efférente, de diamètre plus petit que l'artériole afférente, qui quitte le glomérule au niveau de son pôle vasculaire.

Les constituants du lobule glomérulaire sont: les cellules endothéliales des capillaires, la membrane basale, les cellules mésangiales, la matrice mésangiale ou mésangium intra-glomérulaire, et les podocytes. **(Fig.7)**

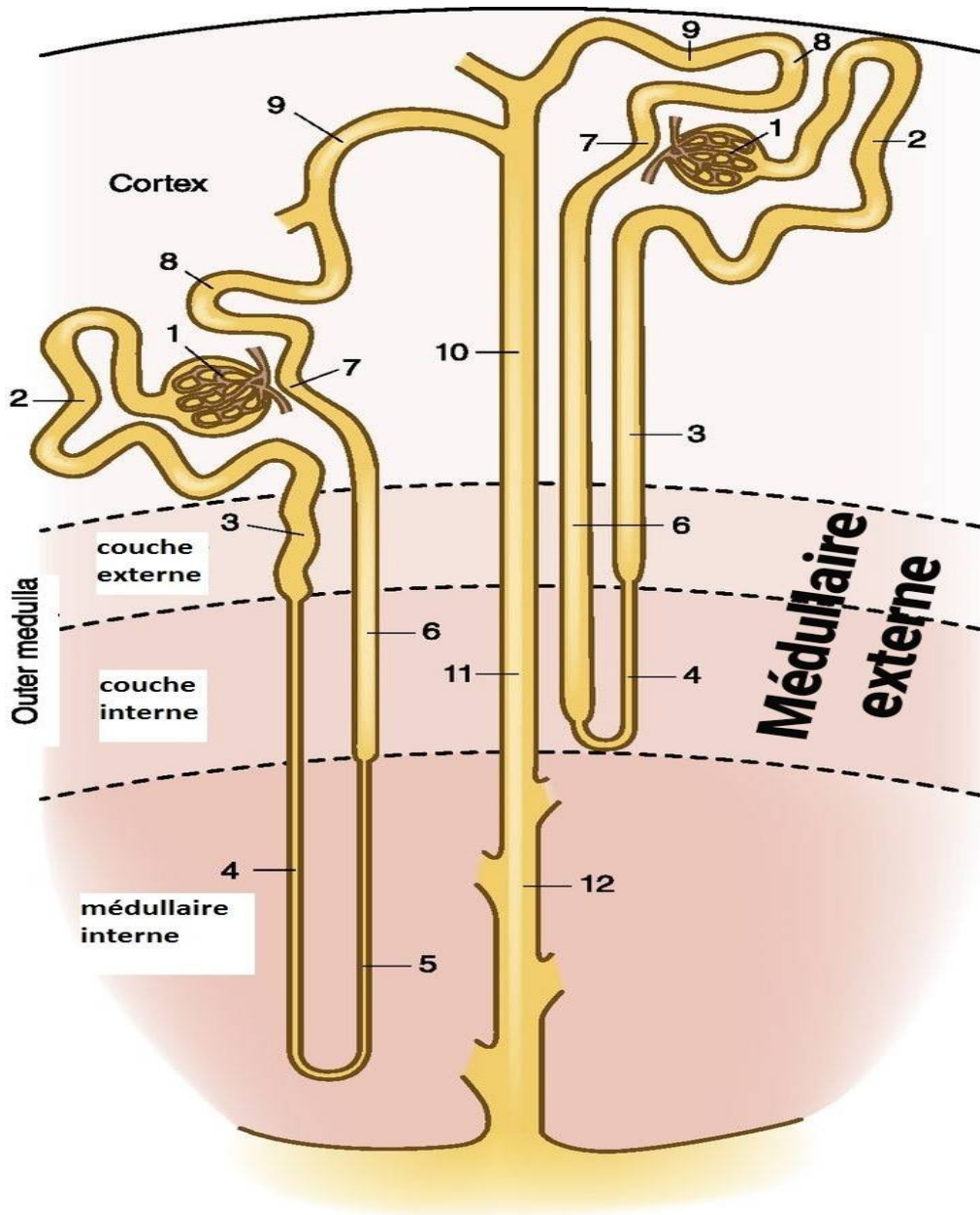


Figure 6: Schéma du néphron[5].

1, glomérule; 2, tubule contourné proximal; 3, tubule droit proximal; 4, membre mince descendant; 5, branche ascendante fine de l'anse d'Henlé; 6, TAL; 7, macula densa; 8, tube contourné distal; 9, tube de connexion; 10, canal collecteur cortical; 11, canal collecteur médullaire externe; 12, canal collecteur médullaire interne.

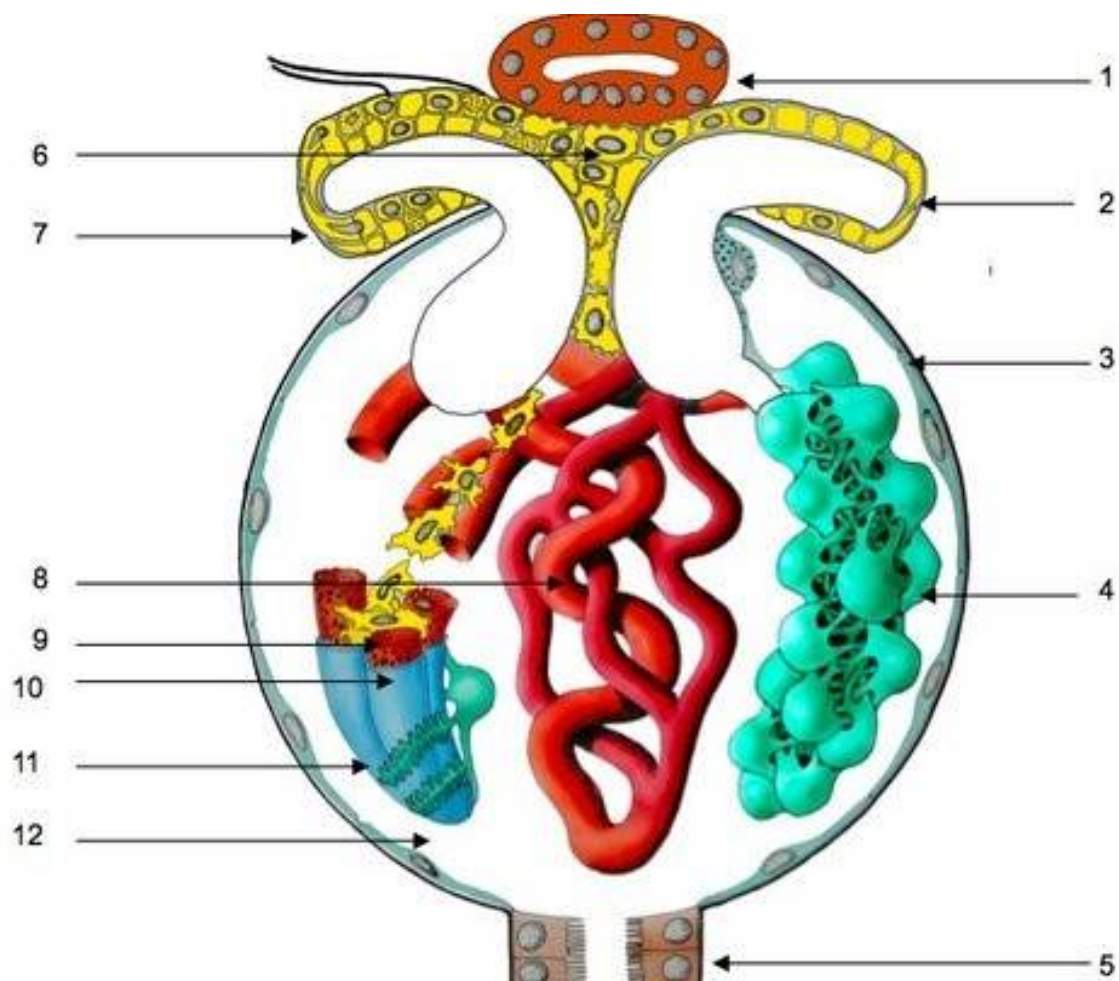


Figure 7: Schéma du glomérule[3].

1. Tube distal et lamina densa
2. Artériole efférente
3. Capsule de Bowman
4. Podocytes
5. Tube proximal
6. Mésangium extra glomérulaire
7. Artériole afférente
8. Capillaires
9. Cellule endothéliale
10. Membrane basale glomérulaire
11. Pédicelles des podocytes
12. Chambre urinaire

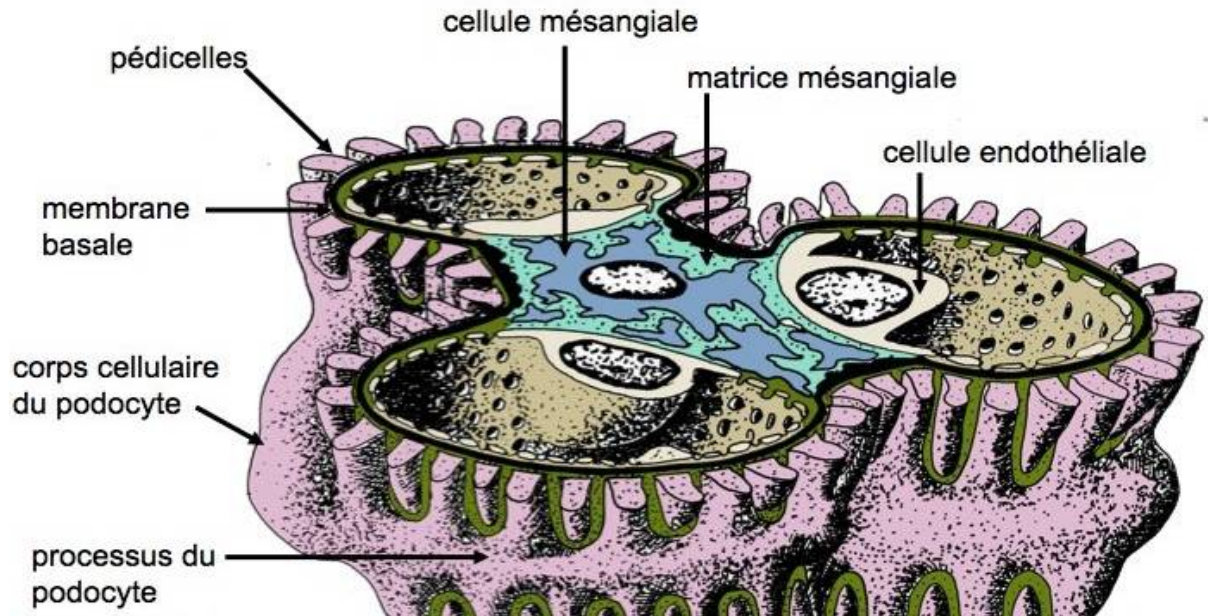


Figure 8: Coupe schématique d'un lobule glomérulaire[3]

- **Les cellules endothéliales** des capillaires sont percées de pores ou fenêtrées.

La partie épaisse du cytoplasme contenant le noyau est non fenêtrée ; elle est adossée au mésangium sans interposition de la membrane basale glomérulaire.

Le reste du cytoplasme est mince perforé de fenêtrées de 70 à 100 nm de diamètre.

La surface luminale de la cellule endothéliale a une charge négative du fait de la présence de glycoprotéines polyanioniques comme la podocalyxine

Les cellules endothéliales sécrètent des molécules impliquées dans la réponse immune et la coagulation et expriment des molécules d'histocompatibilité de classe II.

- **La membrane basale :**

La membrane basale glomérulaire provient de la fusion des membranes basales des podocytes et des cellules endothéliales.

Elle est constituée de 3 couches : la lamina rara interna, la lamina densa (centrale) la plus épaisse et la plus dense aux électrons et la lamina rara externa.

Elle mesure 300 à 350 nm d'épaisseur chez l'adulte, plus épaisse chez l'homme et là où elle recouvre le mésangium

Elle est fine chez l'enfant et atteint l'épaisseur normale vers l'âge de 10 à 12 ans.

Elle est constituée principalement de collagène IV, et de glycoprotéines non collagéniques (laminines, entactine ou nidogéne et protéoglycanes sulfatées comme l'agrine)

Chaque molécule de collagène IV est formée par une triple hélice de trois chaînes α . Il existe 6 chaînes α (de $\alpha 1$ à $\alpha 6$)

Le collagène IV des membranes basales glomérulaires est fait par l'assemblage de 3 chaînes $\alpha 3 \alpha 4 \alpha 5$.

Chaque molécule de collagène IV comporte trois domaines différents : le domaine hélicoïdal central, le domaine 7 S à la partie N-terminale, et le domaine globulaire C-terminal non collagénique NC1 [3].

Le collagène IV et les autres glycoprotéines : permettent l'adhérence des podocytes et des cellules endothéliales et interviennent dans la signalisation cellulaire en se liant aux intégrines.

Rôle des protéoglycanes sulfatées : elles sont responsables de la charge anionique négative des MBG.

- **Les podocytes** : ou les cellules viscérales épithéliales

Ce sont des cellules spécialisées munies d'un corps cellulaire globuleux contenant le noyau et des prolongements cellulaires ou processus qui se ramifient pour donner des pédicelles.

Ce sont des cellules à différenciation terminale.

Elles participent à la synthèse des constituants des membranes basales glomérulaires, à la formation de la barrière de filtration glomérulaire et au maintien de la régulation hydraulique des anses capillaires.

Elles expriment différentes molécules : Wt1, récepteur de C3 b, vimentine mais n'expriment pas les filaments intermédiaires de type cytokératines.

Elles résident dans l'espace urinaire ou chambre de filtration et sont attachées à la MBG par leurs pédicelles.

Le corps cellulaire contient le noyau et les principaux organites : (cytoplasme, appareil de Golgi, lysosomes et mitochondries)

Les processus cellulaires contiennent des microtubules et des filaments intermédiaires de type vimentine et desmine.

Les pédicelles : reposent sur la membrane basale et ménagent avec les pédicelles du podocyte adjacent une fente appelée fente de filtration.

La fente de filtration est limitée en bas par la lamina rara externa, latéralement par les pédicelles de deux podocytes adjacentes et en haut par le diaphragme de fente

Le diaphragme de fente a une structure en « fermeture éclair ».

Ainsi, on distingue trois domaines podocytaires :

Le domaine apical, le domaine basal et domaine latéral ou zone du diaphragme de fente
(Fig.8)

Le tableau I : précise la constitution moléculaire de chacun de ces domaines.

L'identification des molécules de ces domaines, en particulier la zone du diaphragme de fente, a permis de comprendre les syndromes néphrotiques familiaux.

Tableau I : les trois domaines des podocytes et leurs protéines, rôle dans la fonction et la forme du podocyte.

<i>Domaine</i>	Nom	Rôle
<i>Domaine apical</i>	GLEEP-1 podocalyxine	-Responsable de la charge négative du glycocalyx nécessaire pour le maintien de l'architecture du flocculus -Sa diminution entraîne un effacement des pédicelles et un aplatissement du podocyte.
<i>Domaine latéral</i>	Néphrine(superfamille des Ig)	Joue le rôle de signalisation
	Podocine	Interagit avec le Neph1 CD2AP
<i>(zone diaphragme de fente)</i>	Neph 1	Interagit avec la néphrine, podocine et le ZO1
	ZO1	Relie le neph 1 au réseau d'actine
	Fat 1	Protocadhérine
<i>Domaine basal ou semelle du pédicelle</i>	Intégrine $\alpha_3 \beta_1$	Relie les glycoprotéines, de la membrane basale au réseau d'actine par l'intermédiaire de la vinculine , de la paxilline et de la taline
	Les dystroglycanes	L'ancrage du pédicelle dans MBG
	Endopeptide neutre (CD10)	

- **Les cellules mésangiales et la matrice mésangiale :**

o **Les cellules mésangiales :**

À l'état normal, on observe 1 à 2 noyaux par aire mésangiale (sur une coupe de 2 μm).

La cellule possède de nombreuses expansions cytoplasmiques.

Elle forme des jonctions cellulaires avec les cellules endothéliales et les autres cellules mésangiales.

Les cellules mésangiales possèdent des caractéristiques des cellules musculaires lisses ainsi, elle exprime l'actine, l'alpha-actinine, la myosine, les tropomyosines, ainsi que des filaments intermédiaires de type vimentine.

Elle a également des capacités de phagocytose, et participe ainsi l'élimination des débris cellulaires, des corps apoptotiques et des complexes immuns lors des glomérulonéphrites.

La cellule mésangiale sécrète des molécules participant à la formation de la matrice mésangiale et à sa dégradation.

○ **La matrice mésangiale :**

Elle constitue l'axe du lobule intra glomérulaire

Elle est composée de microfibrilles (la fibrille 1), de collagène IV avec ses chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$; les laminines et la fibronectine.

Elle a une structure poreuse avec des espaces ménagés entre les fibrilles, ceci explique que des macromolécules retenues par la membrane basale glomérulaire, diffusent largement dans le mésangium.

- **La capsule de Bowman :**

L'enveloppe du glomérule s'appelle la capsule de Bowman.

Celle-ci est constituée de cellules épithéliales pariétales reposant sur une membrane basale.

○ **Les cellules épithéliales pariétales :**

- Ce sont des cellules aplaties tapissant la face interne de la capsule de Bowman.
- Elles expriment PAX-2, claudin-1...
- Elles se continuent dans le pôle vasculaire avec les podocytes, et dans le pôle urinaire avec les cellules épithéliales tubulaires.
- Elles jouent un rôle important dans les phénomènes de réparation/ régénération glomérulaires.
- Un certains nombre de cellules pariétales ont les caractéristiques des cellules souches et expriment CD24 et CD133
- Elles sont impliquées dans la régénération des podocytes et des cellules épithéliales tubulaires.

- Elles sont retrouvés dans le pôle vasculaire et portent le nom de cellules transitionnelles/ podocytes pariétaux ou cellules périportales.
- Elles possèdent des pédicelles et des diaphragmes de fente et expriment les marqueurs des podocytes.
- Les cellules pariétales activées sont formées en réponse à différentes lésions glomérulaires.
- Elles sont cubiques à cytoplasme abondant et coexpriment les protéines des **cellules épithéliales** et le **CD44**.
- Elles forment des croissants cellulaires et migrent aux segments glomérulaires scléreux dans la hyalinose segmentaire et focale.
- Elles sont, pour certains auteurs à l'origine des pseudos croissants de la hyalinose segmentaire et focale de type « collapsing ».
- Elles secrètent des constituants de la matrice extracellulaire sous l'action de TGF- β sécrété par les podocytes.

○ **Membrane basale de la capsule de Bowman :**

Elle est en continuité avec la membrane basale tubulaire proximale au pôle urinaire et avec la MBG au pôle vasculaire.

Elle est d'aspect pluri lamellaire en microscope électronique et contient du collagène IV ($\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6$), la laminine et l'entactine.

d- Le tube rénal :

• **Tube contourné proximal :**

Il comprend une partie initiale située dans le cortex et une portion droite située dans la médullaire.

L'urine primitive est évacuée par le pôle urinaire du glomérule vers le tube contourné proximal. Au cours du passage dans les tubes rénaux, certaines substances sont réabsorbées, d'autres sont sécrétées.

Les cellules épithéliales qui constituent le tube proximal sont cubiques hautes avec un noyau en position basale. Elles sont caractérisées par :

- De très nombreuses microvillosités allongées qui forment une bordure en brosse à leur pôle apical. Les enzymes présentes (ATPases, peptidases, phosphatases, endopeptidase neutre CD10, dissaccharidases) et les transporteurs de la bordure en brosse assurent la réabsorption quasi complète d'acides aminés et de sucres dont le glucose de l'urine primitive,

- Des complexes de jonction (zonula occludens associées à des zonula adhaerens et desmosomes),

- De nombreuses mitochondries très allongées qui se disposent perpendiculairement à la membrane du pôle basal et se situent entre les replis de celle-ci, (bâtonnets de Heidenhain). Elles sont responsables du caractère éosinophile du cytoplasme

- Un appareil de Golgi bien développé ainsi que de nombreux lysosomes et vésicules d'endocytose, de profonds replis de la membrane de leur pôle latéro-basal qui déterminent des prolongements cytoplasmiques interdigités avec ceux issus des cellules voisines. Ce qui explique que les limites cellulaires soient mal visibles en microscope optique.

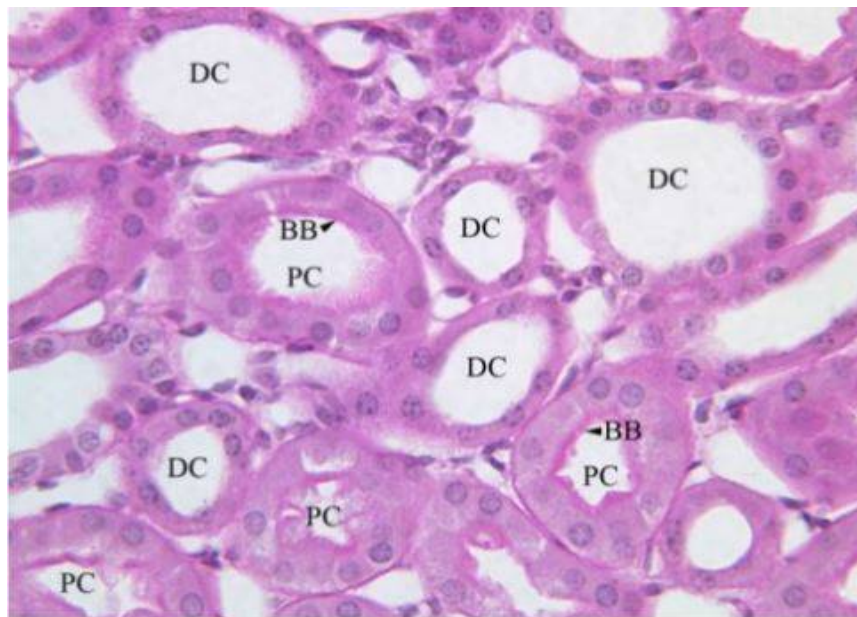


Figure 9: Tube proximal et distal du rein normal. MO ; coloration H&E

DC ; tube contourné distal, PC ; tube contourné proximal, BB ; bordure en brosse[4].

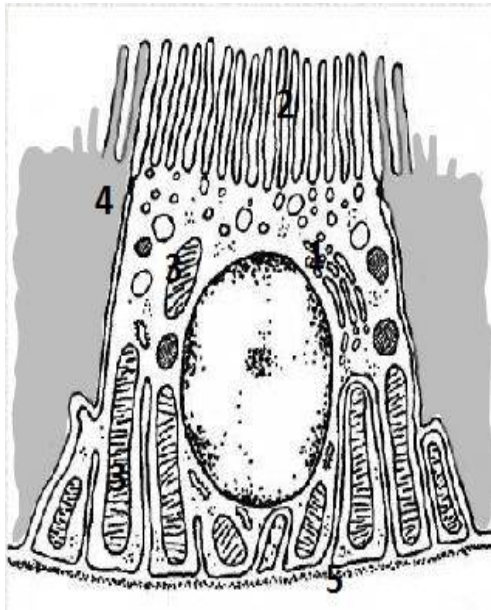


Figure 10: Une cellule du Tube contourné proximal [5]

1. Golgi
2. Microvillosité
3. Mitochondrie
4. Interdigitation
5. Lame basale.

- **Anse de Henlé :**

L'aspect des cellules constitutives de l'anse grêle de Henle (branches descendante et ascendante) est pavimenteux, et contient peu d'organites. Dans la portion large, essentiellement ascendante, les cellules sont cubiques avec présence de mitochondries basales. Elles sont positives avec la cytokératine 7

- **Tube contourné distal :**

Il comprend deux portions :

- Une portion droite qui rejoint la macula densa de l'appareil juxta-glomérulaire
- Une portion contournée.

Les cellules épithéliales du tube distal sont plus cubiques et plus claires que le tube proximal et possèdent peu de microvillosités au pôle apical (pas de bordure en brosse); au pôle basal les invaginations de la membrane plasmique qui contiennent aussi des mitochondries sont toutefois moins développées qu'au niveau du tube contourné proximal.

Au niveau du pôle vasculaire, l'épithélium du tube contourné distal se différencie et présente une « macula dense ».

Les cellules de la portion droite du tube distal synthétisent la protéine de Tamm Horsfall qui est le constituant principal des cylindres. Cette protéine serait responsable de l'imperméabilité à l'eau de l'anse de Henlé.

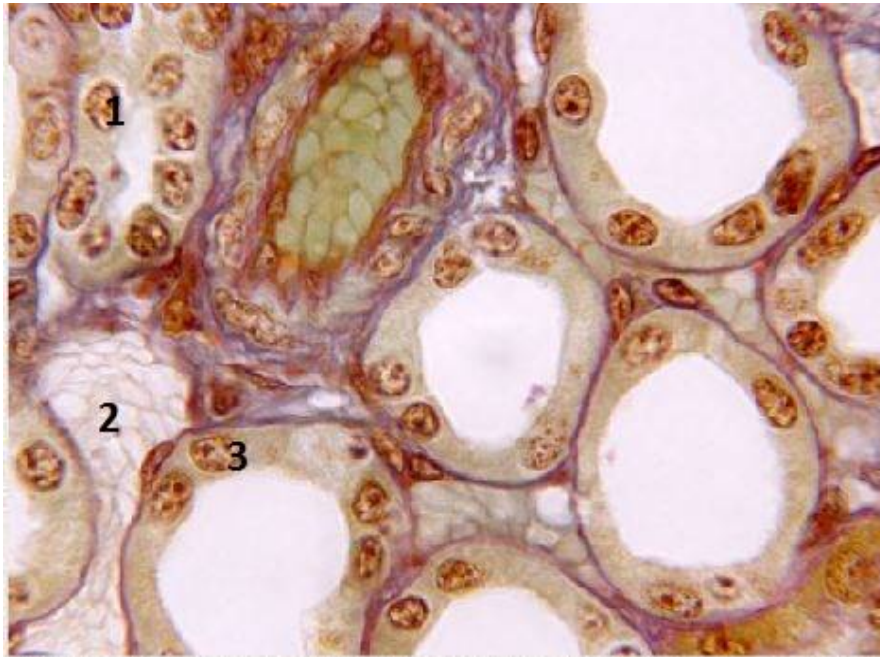


Figure 11:Tube contourné distal ; MO, Trichrome bleu

1. tube contourné distal ; 2. Vaisseaux ; 3. Cellule de l'anse de Henlé[5].

- **Tube collecteur :**

L'épithélium des tubes collecteurs est constitué de deux types de cellules :

Des cellules claires principales, les plus nombreuses, ayant à leur face apicale de rares et courtes microvillosités. Elles sont pauvres en organites. Elles expriment les cytokines 7 et 19.

Des cellules intercalaires (ou cellules alpha), sombres, moins nombreuses, reconnaissables en ME et présentent à leur pôle apical des microvillosités et au pôle basal des replis de la membrane plasmique avec des mitochondries. Elles renferment de nombreux ribosomes et des vacuoles.

Près de la papille, plusieurs tubes collecteurs s'unissent pour former les canaux de Billini

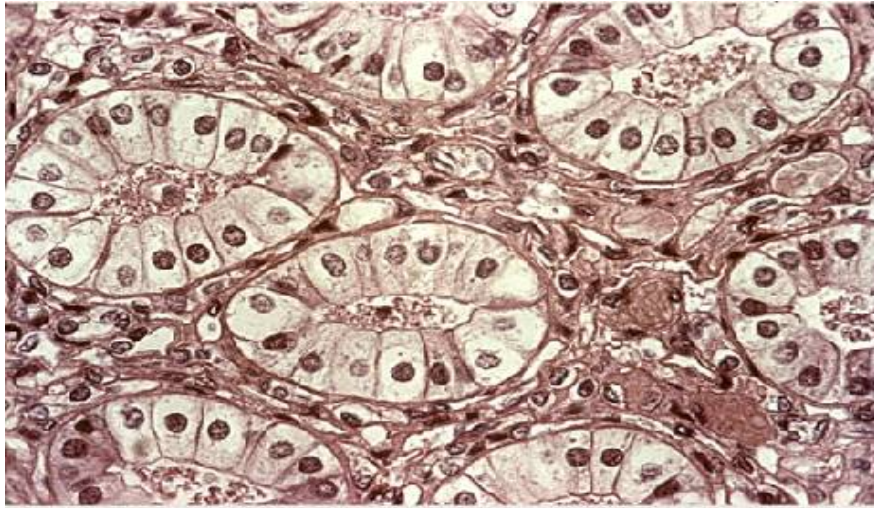


Figure 12:Tube collecteur 1rénal, MO, Coloration argentique [5].

e- Appareil juxta-glomérulaire du rein :

Il est situé contre le glomérule, dans l'angle formé par les artérioles afférente et efférente.

L'appareil juxta-glomérulaire est constitué par les cellules myo-épithélioïdes, les cellules du lacis et la macula densa.

- Les cellules myo-épithélioïdes :

Ont un double phénotype, contractile et sécrétoire.

Elles se substituent aux cellules musculaires lisses de l'artériole afférente lors de la pénétration dans le glomérule. Leur cytoplasme est caractérisé par une double différenciation musculaire lisse (myofibrilles) et glandulaire endocrine (vésicules de sécrétion).

Elles sécrètent de la rénine dans le sang de l'artériole afférente.

La régulation de la sécrétion de rénine est liée au niveau de la pression sanguine dans l'artériole afférente et à la teneur en sodium de l'urine tubulaire distale (la macula densa jouant le rôle d'osmorécepteur).

- **Les cellules du lacis :**

Les cellules du lacis sont situées dans l'espace triangulaire compris entre l'artériole afférente, l'artériole efférente et le tube contourné distal.

Elles sont disposées au sein d'un réseau de lames basales semblables aux cellules mésangiales avec lesquelles elles sont en continuité.

• **La macula densa :**

La macula densa est la région du tube contourné distal qui repose par l'intermédiaire de sa lame basale sur les cellules myo-épithélioïdes. A ce niveau, la béance des espaces intercellulaires fait que l'urine entre en contact direct avec la lame basale du tube contourné distal.

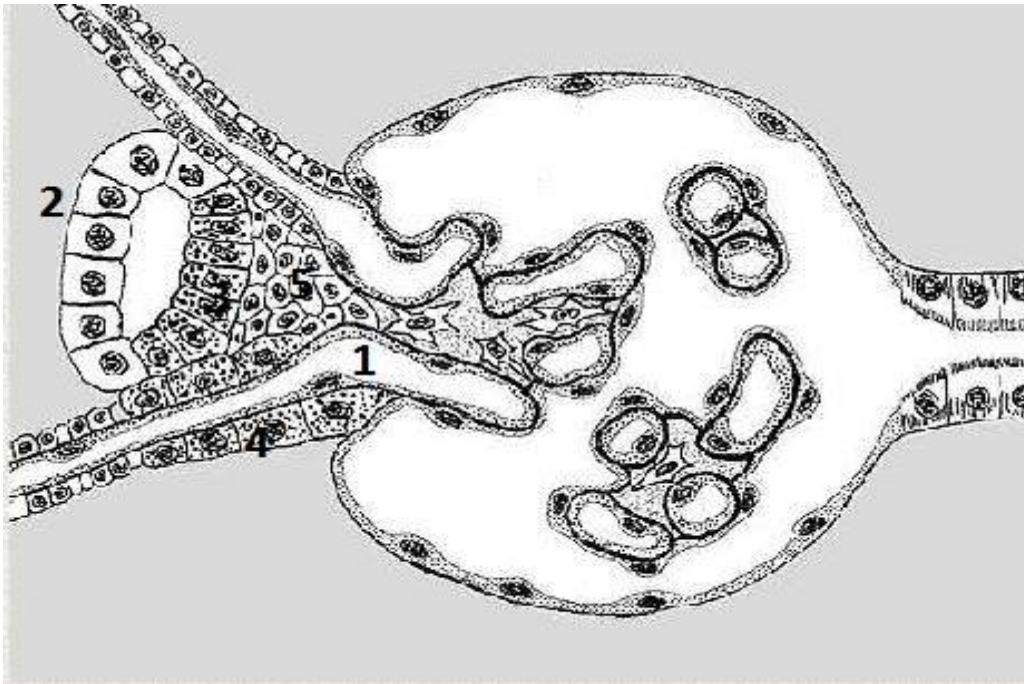


Figure 13: L'appareil juxta-glomérulaire [5].

1. Artériole glomérulaire afférente ; 2. Tube contourné distal ; 3. Macula densa ;
4. Cellules myo-épithélioïdes ; 5. Cellules de lacis

f- Interstitium :

L'interstitium rénal est plus important dans la médullaire

Il occupe un volume de 5 à 10% dans le cortex et de 40 à 100% dans la médullaire.

Il est formé de cellules interstitielles (fibroblastes, cellules dendritiques et macrophages et d'une matrice (collagènes fibrillaires du type I, II, III, IV, de glycosaminoglycannes de laminines et fibronectine).

Dans les conditions pathologiques : la fibrose est due à l'accumulation de collagènes I, III.



CLASSIFICATION DES MALADIES RENALES

IV. CLASSIFICATION DES MALADIES RENALES :

Il existe de nombreuses maladies qui touchent les reins, voici la classification des principales pathologies rénales.

1-Maladies glomérulaires :

- Lésion glomérulaire minime et glomérulonéphrite avec lésion segmentaire de type « hyalinose segmentaire et focale »
- Glomérulonéphrite extra-membraneuses
- Glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'IgA et purpura rhumatoïde
- Glomérulonéphrite extra capillaires ou à croissants
- Glomérulonéphrite membranoprolifératives
- Glomérulonéphrite aiguës d'origine infectieuse
- Glomérulonéphrite à dépôts organisés d'immunoglobulines
- Atteinte glomérulaire au cours des dysglobulinémies et des cryglobulinémies
- Amyloses rénales
- Glomérulonéphrite rares

2- Maladies vasculaires rénales :

- Néphro-angiosclérose
- Vascularite rénale
- Maladie des embolies de cristaux de cholestérol
- Micro-angiopathie thrombotique
- Sclérodémie systémique
- Syndrome des antiphospholipides

3- Néphropathies particulières :

- Atteinte rénale au cours du diabète sucré
- Atteinte rénale au cours du lupus érythémateux disséminé
- Néphropathie et maladie du foie
- Atteinte rénale et infection par VIH
- Glomérulonéphrite au cours des infections virales (hors infections virales du foie et hors VIH)
- Atteinte rénale au cours de la drépanocytose
- Atteinte rénale au cours des hémopathies malignes
- Atteinte rénale au cours du syndrome d'activation macrophagique
- Atteinte rénale au cours de la grossesse

4- Maladies tubulaires et interstitielles :

- Nécrose tubulaire aiguë
- Néphrite interstitielle aiguë : infections, agressions immunologiques, cristaux
- Tubulopathie myélomateuse et autres atteintes tubulo-interstitielles au cours des dysglobulinémies
- Néphrite interstitielles granulomateuses
- Néphropathies tubulo-interstitielles toxiques
- Néphropathies tubulo-interstitielles chroniques, néphrocalcinose et pyélonéphrite chroniques
- Pyélonéphrite xanthogranulomateuse et malakoplakie

5- Maladies héréditaires :

- Maladies héréditaires de la membrane basale glomérulaire et du podocyte
- Maladie métabolique héréditaires
- Dyslipidoses : maladie de fabry
- Néphronopathie et néphropathie kystiques de la médullaire

6-Pathologie de la transplantation :

- Toxicité médicamenteuse
- Infections virales
- Lymphoprolifération après transplantation

7-Autre :

- Anomalies du développement rénale
- Maladie kystiques rénales héréditaires
- Tumeurs des reins



***TECHNIQUES D'ETUDE
ANATOMOPATHOLOGIQUE
DES BIOPSIES RENALES***

V. TECHNIQUES D'ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE DES BIOPSIES RENALES :

En raison de la complexité des maladies rénales, la biopsie rénale doit être techniquée selon des méthodes optimales permettant une évaluation complète. Ces méthodes sont représentées par la MO, l'IHC (immunopéroxydase et IF) et la ME. Celle-ci est indiquée dans des situations particulières.

Toute biopsie rénale doit être accompagnée d'une feuille de demande d'examen anatomopathologique où doivent figurer :

- les identifiants du patient ;
- l'adresse du patient et/ou du service de consultation ou d'hospitalisation;
- le nom du médecin préleveur et ses coordonnées ;
- le caractère urgent éventuel de la demande ;
- la nature du prélèvement ;
- le siège du ou des échantillons ;
- la date et l'heure du prélèvement ;
- les renseignements cliniques pertinents ;
- les recherches particulières demandées.

Bien que cela, ne remplace pas la communication directe avec le médecin qui soumet la demande, ces informations cliniques constituent la base pour une bonne interprétation de la biopsie rénale.

1. Examen macroscopique de la biopsie rénale et acheminement au laboratoire d'anatomie pathologique:[6,7,8]

Le caractère adéquat du prélèvement réalisé peut être vérifié à l'aide d'une loupe optique (Fig.15) ou d'un microscope à dissection (Fig.16) ou d'un microscope à lumière ordinaire (Fig.14)

Le fragment est retiré de l'aiguille de biopsie par une aiguille ou bâtonnet de bois mince (cure –dent), et placé sur une lame de verre avec une solution saline (Fig.17) et examiné avec ou sans lamelle.

Certains artéfacts d'écrasement sont produits par la mauvaise manipulation de l'échantillon. Il faut donc éviter d'utiliser : des pinces, tirer ou étirer un tissu, placer le tissu sur une gaze sèche ou une gaze imbibée d'eau, congeler l'échantillon entier ou le placer sur une solution saline glacée.

Un néphrologue entraîné pourrait reconnaître un tissu grasseux, musculaire strié ou autre tissu.

Le prélèvement se présente sous forme d'une « carotte » de 5 à 20 mm, de couleur blanc-rosé, de consistance ferme. L'examen à l'œil nu permet avec un peu d'habitude de distinguer le cortex de la médullaire. L'examen à loupe est plus précis, mais il est peu pratiqué. Les prélèvements sont alors divisés en deux ou trois selon leur taille.

Ainsi, le nombre de glomérules pourrait être vérifié et guider la division des fragments obtenus pour les différentes techniques. Les glomérules apparaissent comme des zones rondes et rouges. La médullaire a un aspect mosaïque en bois avec des stries rougeâtres et dépourvue de structure glomérulaire (Fig18, 19).

En cas de non visualisation des glomérules, un protocole standard est appliqué (Fig.20) pour la division des fragments tissulaires obtenus à chaque passage pour éviter une erreur d'échantillonnage (biopsie aglomérulaire).

Ce protocole consiste à :

- Prélever les deux extrémités des fragments (1 mm de chaque côté) pour une étude en ME ; elles sont placés dans du formol ou glutaraldéhyde ou autre fixateur adéquat pour une étude en ME.
- Couper Le 1^{er} fragment en deux par section transversale
- La plus grande pièce est fixé dans du formol ou autre fixateur pour étude en microscope optique.
- La plus petite pièce est réservée à l'étude en IF
- Couper Le 2eme fragment en deux :
- La plus grande pièce est destinée à l'étude en IF.
- La plus petite sera placée dans du formol pour une étude en MO

Si les deux fragments contiennent du cortex, l'un est utilisé pour une étude en MO et l'autre pour une étude en IF.

Si on obtient un seul fragment, la priorité des différentes analyses sera guidée par le contexte clinique.

L'échantillon doit être coupé avec un scalpel frais ou une lame tranchant propre et non exposé à un fixateur.

Les fragments destinés à l'étude en IF sont placé dans un milieu de transport Michel (solution mère ph 7 ; citrate de K :4, 05g dans 12,5 ; sulfate de Mg 0,62 dans 25ml ; N-éthylemaleimide 0,312g +4°C dans 25ml et H2O distillée 437,5ml ; solution fille : ph7 55g d'ammonium et 100ml de solution mère, le PH7 est ajusté par adjonction de NaOH 1M).

Un échantillon en milieu de transport de Michel doit être lavé avant la congélation.

Si l'échantillon met plus de 30 minutes à arriver au laboratoire, il est recommandé de le réfrigérer en mettant le récipient contenant la biopsie dans un autre contenant des glaçons. Il ne faut pas mettre l'échantillon dans le congélateur; la température recommandée est proche de 4°C.



Figure 14: Microscope optique binoculaire



Figure 15: Une loupe à manche



Figure 16: Microscope à dissection

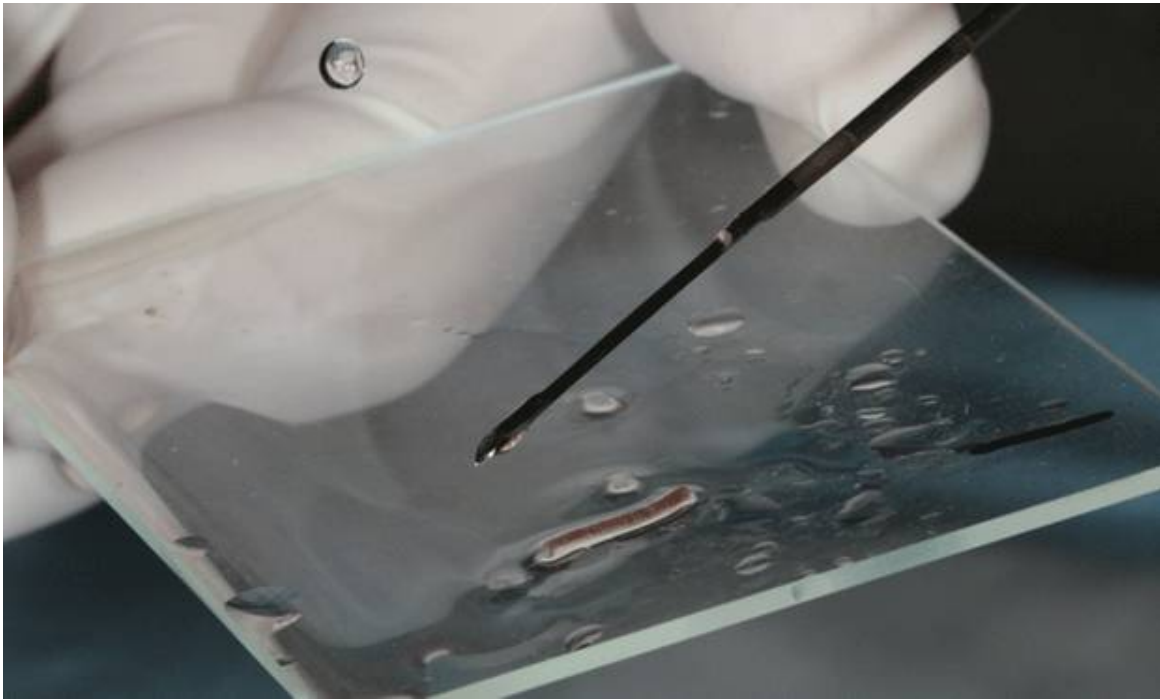


Figure 17: Fragment de biopsie rénale sur lame de verre avec une solution saline[7]



Figure 18: Glomérule à l'état frais vu par un microscope à dissection [7].

A, Aspect de bois du cortex rénal montrant des structures circulaires rougeâtres, typiques des glomérules.

B, Aspect de bois du fragment rénal, montrant des stries rougeâtres et dépourvues de structures glomérulaires typiques (grossissements originaux 10 [A] et 20 [B]). Photographies gracieuseté d'Alexis Harris, MD et Myra Zucker

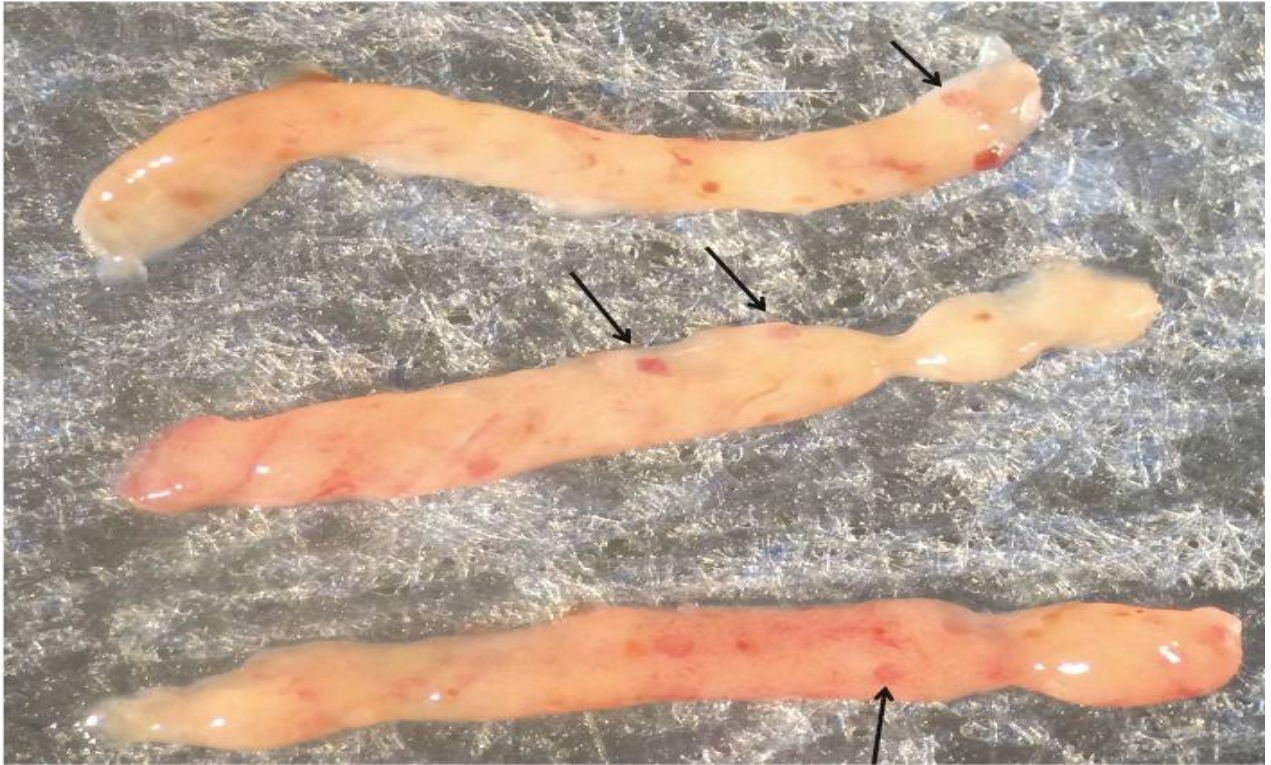


Figure 19: Glomérule à l'état frais vu avec une loupe [9].

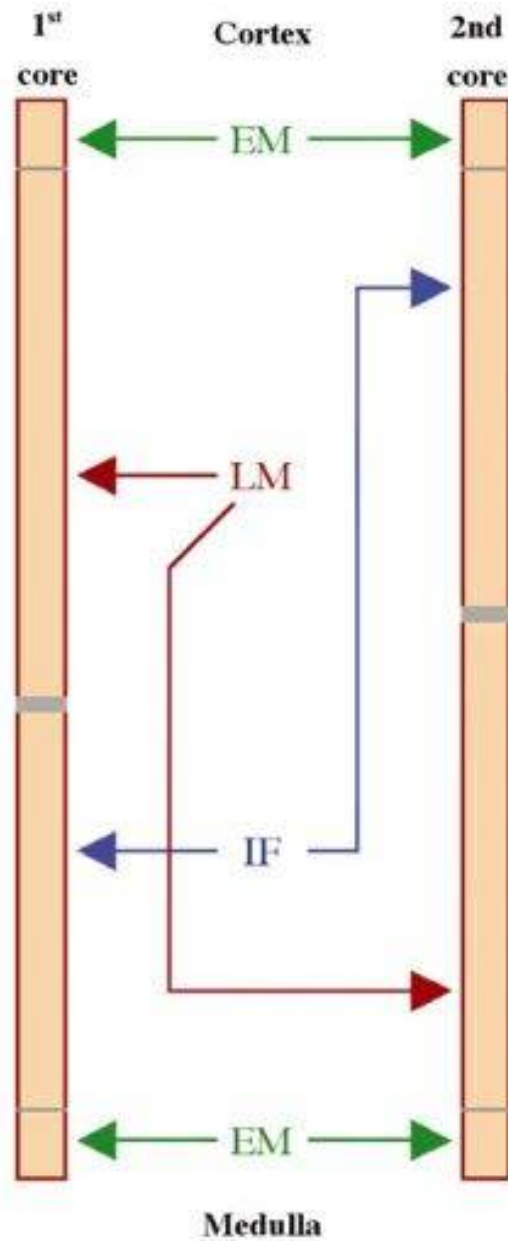


Figure 20: Diagramme pour illustrer la division des fragments de biopsie rénale en l'absence d'un microscope à dissection pour les laboratoires utilisant l'immunofluorescence et la ME [7]

2- Microscope optique :

L'examen au microscope optique est la première étape de l'étude anatomo-pathologique

Elle permet l'étude de la morphologie architecturale globale du parenchyme rénal, et l'analyse des lésions élémentaires des constituants du rein (glomérules, tubes, vaisseaux et tissus interstitiels).

a- Préparation du prélèvement :[3,7,8]

a-1 Fixation :

Placer la carotte destinée à l'étude en microscope optique sur un bristol et mettre le tout dans le fixateur.

Le fixateur le plus utilisé est le formaldéhyde tamponé à 10% de haute qualité (formol). Il pénètre et fixe rapidement les tissus, et fournit une morphologie acceptable.

Les tissus fixés par du formol peuvent servir comme matière de réserve pour l'étude en IHC et de biologie moléculaire, car il préserve les sites antigéniques importants.

Les fixateurs à base de mercure, alcool de Bouin, Dubosq-Brasil, le fixateur de Zenker préservent certains détails morphologiques, mais ne peuvent pas être utilisés pour des études en IHC.

Le fixateur alcool-formol acétique (AFA), permet une fixation immédiate et qui se poursuit 2 à 3 heures. Il donne de très bons résultats avec des tissus qui sont ensuite colorés avec le trichrome Masson.

Le Méthacarn, un fixateur de Carnoy modifié (alcool méthylique 60%, chloroforme 30%, acide acétique glacial 10%), permet une bonne fixation pour l'étude en MO, ME et biologie moléculaire.

Les fragments doivent être manipulés avec précaution pour éviter les artéfacts et les pertes pendant le traitement.

Les fragments doivent être enfermés dans du papier humidifié par un fixateur, pour empêcher sa perte par les trous des cassettes au cours du traitement. Il ne faut pas utiliser un sac en plastique ou une éponge (source d'artéfact).

a-2 Déshydratation : [10]

Elle Consiste à immerger les échantillons dans une série de solutions d'éthanol (alcool) de concentration croissante jusqu'à ce que de l'alcool pur et sans eau soit atteint, pour éliminer le maximum d'eau de l'échantillon, avant son inclusion dans la paraffine, car celle-ci est hydrophobe.

Une série de solution d'alcool de concentrations croissantes est utilisée pour éviter une distorsion excessive du tissu.

Une séquence de déshydratation typique pour des échantillons ne dépassant pas 4 mm d'épaisseur serait :

- 1.Éthanol à 70% 15 min
- 2.90% d'éthanol 15 min
- 3.100% éthanol 15 min
- 4.100% éthanol 15 min
- 5.100% éthanol 30 min
- 6.100% éthanol 45 min

a-3 Inclusion en paraffine :

Le milieu d'inclusion est constitué par un mélange de paraplast et de paraffine, facilitant les coupes fines

Actuellement, l'inclusion est pratiquée dans des automates programmés à la demande.

a-4 Coupes :

Des coupes sériées, nombreuses de 2 à 3 μ m d'épaisseur sont effectuées par un microtome

Les coupes minces permettent de révéler les fins détails structuraux et cellulaires

Le nombre de coupes varie selon les centres.

Des lames blanches entre les différents niveaux peuvent être gardées pour des colorations ou l'immunohistochimie.

Les coupes sont distribuées sur 05 lames pour 2à4 sections sur chaque lame ce qui fait 20 coupes au total.

a-5 Colorations :

Plusieurs colorations sont utilisées : HE, trichrome de Masson, PAS, coloration argentique

On procède selon un protocole alternant les colorations. Il consiste à colorer la première lame avec un HE, la 2ème avec la coloration argentique de Jones, la 3ème avec un PAS, la 4ème avec le trichrome Masson, et la 5ème avec un deuxième HE (fig).

Cette méthode permet d'examiner chaque lésion sur des sections consécutives avec les différentes colorations.

Il existe deux groupes de coloration :

➤ Colorations systématiques :

- Hématoxyline-éosine :

C'est une coloration bichromatique avec double coloration, nucléaire et cytoplasmique, par l'hémalum et la phloxine.

Elle permet l'étude de la **cellularité**.

Elle colore les noyaux en bleu, les cytoplasmes et les lames élastiques en rose, et en rouge vif les fibres musculaires et les hématies.

- Trichrome de Masson (vert lumière ou bleu) :

La coloration de trichrome Masson est utilisée pour étudier la **matrice extracellulaire, les dépôts anormaux, la nécrose et la cellularité**.

Cette méthode colore les noyaux en bleu ou violet, les cytoplasmes en rose, et le Collagène en vert clair. Elle colore les dépôts immuns en rouge ou vert foncé, les membranes basales et le mésangium en vert.

- **La coloration à l'acide périodique Schiff (PAS) :**

L'acide périodique est un agent oxydant, rompt les liaisons 1-2 glycol et amino alcool des glucides et des glycoprotéines et forme des aldéhydes. Ces aldéhydes sont ensuite combinés au réactif de SCHIFF (fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux) qui donne une couleur rouge pourpre aux structures contenant les aldéhydes.

Cette méthode permet d'étudier le **matériel matriciel** et les **dépôts hyalins**.

Le PAS colore en rose la matrice mésangiale, les membranes basales et les bordures en brosse des tubes.

-**La coloration argentique :**

Il existe deux méthodes de colorations : **la technique de Jones** et la **technique de Marinozzi**.

Elle permet une imprégnation sélective et bien marquée, grâce à deux facteurs : l'introduction d'une pré-imprégnation avec un sel ferrique, et l'utilisation, pour l'apport d'argent, d'une complexe diamine (solution ammoniacale) labile, et donc plus réactif que le nitrate d'argent.

Elle permet l'analyse des **membranes basales** et le **matériel matriciel**.

L'imprégnation argentique colore les fibres de réticuline en noir intense, les fibres de collagène en brun pourpre léger, et les noyaux en rouge rosé.

Elle permet l'étude des anomalies des parois capillaires : double contours ou aspect « en rail » de la membrane basale glomérulaire et pour les dépôts extra-membraneux : les expansions de la membrane basale glomérulaire « spicules ou chaînettes »

➤ **Colorations spéciales complémentaires:**

Les colorations spéciales sont réalisées pour déterminer des structures ou des substances observées par le pathologiste lors de l'analyse initiale des coupes avec les colorations standard.

Les techniques histochimiques sont basées sur des réactions biochimiques qui permettent de mettre en évidence in situ, les différents constituants (lipides, glucides, protéines, acides nucléiques, métaux, etc).

- **Rouge Congo :**

La coloration par le rouge Congo nécessite des Coupes de 4µm.

C'est un colorant qui fait partie de la catégorie des polyazoïques parce qu'il possède deux chromophores (région de la molécule qui est principalement responsable de la teinte) de type azoïque, c'est-à-dire formés chacun de deux atomes d'azote doublement liés, et diversement substitué [annexe I].

Il a tendance à se fixer sur des structures basiques. Il se fixe sélectivement entre les chaînes protéiques bêta plissées qui forment le dépôt amyloïde. Le colorant se lie aux fibrilles par l'intermédiaire de liens hydrogène qui se constituent entre les groupes hydroxyles des glucides de l'amylose et de groupes amine et azoïque du colorant.

La réalisation d'un témoin positif est souhaitable.

- **Cristal violet :**

La coloration par le cristal violet nécessite des coupes de 4 µm.

Il colore les dépôts amyloïdes en violet.

- **Orcéine :**

C'est un colorant acide faible qui se fixe avec une grande électivité sur les fibres et lames élastiques internes des vaisseaux.

Il colore les fibres élastiques en brun acajou, les noyaux et les cytoplasmes en rouge à rose

- **Von kossa :**

La coloration Von Kossa permet de démontrer les dépôts de calcium ou de sel de calcium,

Le principe de cette coloration est basé sur la transformation des sels de calcium en sels d'argent : les ions calciques, liés aux phosphates, sont remplacés par des ions d'argent apportés par une solution de nitrate d'argent. Placé sous une source lumineuse, les phosphates d'argent subissent une dégradation photochimique, conduisant à l'observation de dépôts d'argent métallique.

Cette méthode colore les dépôts calciques en brun-noirâtre.

- **Rouge tungstique de Mallory :**

Cette technique permet d'identifier la présence de la fibrine.

Elle utilise trois solutions de colorations et un polyacide pour produire des érythrocytes jaunes, de la fibrine rouge et du collagène bleu.

- **La coloration d'Huile rouge :**

Cette coloration peut être pratiquée sur des coupes congelées, ou des échantillons frais.

Elle permet de visualiser les lipides et les triglycérides.

Elle colore les noyaux en bleu, et les lipides en rouge.

- **Bleu de toluidine :**

C'est un colorant basique, qui utilise le principe de la métachromasie (propriété moléculaire qui fait varier la couleur du colorant en fonction des éléments tissulaires fixés, Le pH, la température et la concentration du colorant).

Il colore les différentes structures en nuance de bleu, le cytoplasme de manière uniforme, la chromatine très légèrement et le nucléole de manière assez intense. Au niveau tissulaire les vaisseaux apparaissent en bleu turquoise

Les modes opératoires/ procédures des différentes colorations figurent sur la partie annexe I.

3 - Immunohistochimie : [8, 9, 11,12]

Les techniques d'immunohistochimie comprennent l'immunofluorescence (IF) et l'immunopéroxydase ou techniques immunoenzymatiques (IP)

3-1 Immunofluorescence :

C'est une technique rapide (en quelques heures) qui permet la recherche de dépôts d'immunoglobulines ou de complément.

Elle permet le plus souvent le diagnostic étiologique d'une glomérulopathie, en fonction de la nature des dépôts.

Un seul glomérule peut suffire au diagnostic.

a- Préparation du prélèvement :

1)- Congélation du fragment :

La congélation se fait dans l'azote liquide, progressivement, afin d'éviter l'éclatement cellulaire.

Le prélèvement non fixé est acheminé au laboratoire, dans une compresse humide et non tissée, imbibée de sérum physiologique. Il est épongé, placé au fond d'une cupule (cryomold) emplie d'un milieu d'enrobage (tissu-tek OCT).

Si le laboratoire est éloigné, le prélèvement est acheminé dans un liquide de transport comme le liquide de Michel.

2)- Des coupes sériées de 2- 4µm, sont effectuées avec un cryostat.

3)- Les coupes sont placées sur des lames propres qui sont pré-étiquetées avec le nom de l'antigène utilisé.

4)- Les coupes sont fixées à l'acétone/ ou à l'air.

5)- Les coupes sont traitées par des anticorps conjugués à un fluorochrome (isothiocyanate de fluorescéine, phycoérythrine ou rhodamine).

- **Technique d'IF standard** :

On réalise systématiquement un immunomarquage direct par des anticorps polyclonaux dirigés contre :

- Les chaînes lourdes d'immunoglobulines : α (Ig A), μ (Ig M), γ (Ig G).
- Les fractions du complément : C3, C4, C1q
- Le fibrinogène.
- L'albumine.

- **Technique d'IF spécifique** : immunomarquage indirect par des anticorps monoclonaux dirigés contre :

- Les chaînes légères Kappa et lambda.
- Les sous-classes d'Ig G.
- Le C4d pour la pathologie de transplantation rénale : utilisé de façon systématique pour le diagnostic du rejet humoral.
- Les chaînes α du collagène IV.
- Les protéines responsables d'amylose : protéine AA, transthyrétine, chaîne alpha du fibrinogène, apolipoprotéine A1, lysozyme, gelsoline, Les chaînes lourdes...
- Les domaines constants de la chaîne lourde : CH1, CH2, CH3
- Les clusters de différenciation leucocytaires.
- Identification du virus.

6)- On procède à la préparation de 3 coupes témoins :

- un témoin négatif : coupe non traitée.
- un témoin faux positif : coupe traitée par un Ac anti-albumine.
- un témoin morphologique : coupe colorée par HE ou PAS.

7)- La lecture des lames se fait par un microscope équipé d'un dispositif d'épifluorescence de grande puissance et des filtres appropriés.

8)-Le stockage des lames se fait dans une chambre froide et à l'obscurité, et peuvent être transmises pour consultation à température ambiante à l'abri de la lumière.

- Les fragments congelés sont conservés au mieux dans l'azote liquide ou à -80°C dans le milieu d'enrobage qui les protège ainsi du dessèchement.

Les coupes non utilisées, séchées à l'air, peuvent être conservées quelques jours à température ambiante, ce qui permet leur transport en cas d'avis extérieur nécessaire, sans avoir à adresser le fragment congelé.

Si elles restent inutilisées elles sont enveloppées dans du papier aluminium et congelées à -20°C. Une fixation en acétone peut se faire au moment de l'utilisation.

La procédure / mode opératoire de la technique d'IF directe et indirecte figure sur la partie annexe II.

3-2 Techniques immuno-enzymatiques : immunopéroxydase (IP)

a- Préparation du matériel :

Cette technique est applicable sur des coupes provenant du fragment fixé et inclus en paraffine ayant servi à l'étude en microscopie optique.

Les matériaux utilisés et le mode opératoire figurent sur la partie annexe (technique immunohistochimie/ immunopéroxydase).

Le tableau n° II compare les avantages et les inconvénients des techniques d'IF et d'Immunoperoxydase

Tableau II : Les avantages et les inconvénients des deux techniques d'immunohistochimie (l'IF et l'IP).

	Avantages	Inconvénients
IF	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Faible cout technique ✓ Facile et rapide 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Ne permet pas la conservation des lames ✗ Peu informative sur la morphologie ✗ Nécessite un microscope à épifluorescence. ✗ Tissus frais congelé non fixé
IP	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Permet d'apprécier la morphologie des lésions ✓ Permet la conservation des lames ✓ Ne nécessite pas un microscope à épifluorescence ✓ Peut être utilisée sur des fragments fixés. 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ La présence de faux négatifs ✗ L'interprétation demande un observateur expérimenté ✗ Technique longue et fastidieuse

4. Microscopie électronique : [8, 9,12 ,13]

L'étude en microscope électronique permet une visualisation directe et une localisation précise d'une grande variété d'anomalies primaires et secondaires affectant le glomérule rénal et d'autres compartiments du parenchyme rénal.

a- Préparation du prélèvement :

1. Fixation :

Le fixateur le plus utilisé pour l'étude en microscope électronique est le **glutaraldéhyde**. D'autres fixateurs peuvent être utilisés comme le paraformaldéhyde ou le formol tamponné

L'étude en ME ne peut pas être effectuée sur des échantillons traités par un fixateur à base de mercure (Zenker, B-5...)

La fixation rapide de l'échantillon fournit les meilleurs résultats.

Il est important de noter que les échantillons congelés ou inclus en paraffine, peuvent servir comme matériel d'étude en ME (après fixation dans le glutaraldéhyde)

2. Coupe :

Des coupes semi fines de 500 nm à 1 µm de diamètre sont effectuées à l'aide d'un ultra microtome. Ensuite les coupes sont placées sur une lame de verre.

3. Coloration par le bleu de toluidine pour sélectionner les zones d'intérêt

La procédure opératoire de la coloration figure sur la partie annexe.

4. Coupes ultrafines à l'ultra microtome de 80 nm, déposées sur des grilles métalliques

5. Coloration avec l'acétate d'uranyle ou sels de plombs

Pour disperser les électrons d'imagerie, et donner du contraste entre les différentes structures.

6. Lecture au microscope électronique.

b- Examen ultastructurale :

Un ou 2 glomérules sont examinés.

L'examen en microscope électronique consiste à réaliser une série de microphotographies à faible, moyen et fort grossissement intéressant les boucles capillaires, la région mésangiale et la zone tubulo-interstitielle.

c- Indications de la MET :

L'utilisation de la ME n'est pas systématique, et elle est à présent réservée aux atteintes rénales rencontrés dans les maladies héréditaires touchant le glomérule notamment:

- Syndrome d'Alport.
- Glomérulonéphrite membrano-proliférative de type II

- Maladie des membranes basales fines
- GP à dépôts monotypiques d'Ig
- Complexes immuns (considérés comme des dépôts denses aux électrons).
- Dépôts granulaires sous-endothéliaux dans la maladie de la chaîne légère kappa
- Corps zébrés (maladie de Fabry)
- Cristaux (Ex. Cristaux de cystine dans la cystinose)

d- Les contraintes :

1. Les Conditions précieuses de conservation du microscope tel qu'une pièce ventilée climatisée, obscure, stable à l'abri des vibrations, une pièce obscure pour le développement photographique. Le laboratoire doit disposer d'un ultra-microtome avec couteaux de diamant.

2. La pratique de la ME ne se conçoit que si elle est confiée à des personnes qualifiées et à un laboratoire entraîné aux pratiques de préparation du prélèvement et à la lecture.

3. Les prélèvements biopsiques humains ne peuvent pas bénéficier des techniques de fixation optimale comme la fixation in situ ou la fixation contrôlée par perfusion artérielle rénale. C'est la raison pour laquelle les images ultrastructurales obtenues chez l'animal sont souvent bien meilleures que celles obtenues sur les prélèvements humains.



***TECHNIQUES NON
MORPHOLOGIQUES***

VI. TECHNIQUES NON MORPHOLOGIQUES :

Il existe d'autres techniques dites non morphologiques qui permettent de confirmer le diagnostic final proposé par le pathologiste.

Le matériel utilisé peut être : du tissu frais, congelé ou fixé et inclus en paraffine.

A. Spectroscopie vibrationnelle : [14, 15, 16,17]

La spectroscopie vibrationnelle est une technique physico-chimique, basée sur l'analyse chimique de l'interaction lumière/ matière et résulte des vibrations moléculaires.

Chaque molécule possède une fréquence spécifique pour laquelle elle tourne ou vibre en correspondance avec des niveaux d'énergie discrets appelés modes vibratoires. Ces modes vibratoires absorbent dans le domaine du proche et lointain infrarouge et sont utilisés comme une véritable signature moléculaire.

La spectroscopie vibrationnelle exploite les modes vibratoires des molécules.

Grâce à cette spécificité du spectre moléculaire, les techniques de spectroscopie vibrationnelle permettent de détecter/ quantifier les molécules exogènes telles que les médicaments, les toxines et **les cristaux** anormalement présents dans les tissus biologiques et notamment le parenchyme rénal.

Les techniques spectroscopiques ont attiré l'attention, en raison de la vitesse et de la précision de l'analyse des échantillons. Parmi ces techniques vibrationnelles de laboratoire, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la spectroscopie RAMAN (SR).

a- Spectroscopie RAMAN : [15]

a.1- Principe :

La spectroscopie RAMAN est basée sur la diffusion d'une lumière monochrome sur l'échantillon, en mode inélastique ou effet RAMAN, et l'analyse de l'énergie émise après son interaction avec les molécules.

La diffusion Raman est un exemple de diffusion élastique en raison du transfert d'énergie entre les photons et les molécules lors de leur interaction. La différence d'énergie entre les photons incidents et diffusés correspond à l'énergie de la vibration [15].

Les vibrations sont spécifiques aux liaisons moléculaires permettant de construire une empreinte biochimique du matériel étudié.

La différence de fréquence entre la lumière incidente et diffusée Raman est appelée décalage Raman, qui est unique pour les molécules individuelles et est mesurée par le détecteur de la machine.

L'étude d'un échantillon par spectroscopie RAMAN nécessite la connaissance préalable du spectre énergétique de la molécule recherchée.

b- La spectroscopie infrarouge :

b.1- Principe :

Le rayonnement infrarouge, dont la longueur d'onde est comprise entre 780 nm et 1000 μm , est une onde électromagnétique d'énergie inférieure à celle de la lumière rouge.

La spectroscopie infrarouge traite principalement la région infrarouge du spectre électromagnétique et se concentre le plus souvent sur la spectroscopie d'absorption (lorsque la fréquence de l'IR est la même que la fréquence vibratoire d'une liaison, l'absorption se produit).

Lorsqu'un échantillon est exposé à un rayonnement infrarouge, le rayonnement absorbé excite généralement les molécules dans un état vibratoire plus élevé. Les longueurs d'onde absorbées par l'échantillon sont caractéristiques de sa structure moléculaire.

Elle apporte des informations chimiques et structurales par comparaison avec les spectres de référence de la banque de données.

B. Spectrométrie de masse : [18,19]

a. Généralités :

Les molécules biologiques sont composées essentiellement de nucléides (le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote...). Chaque nucléide correspond à une masse atomique.

La masse moléculaire se calcule par l'addition de l'ensemble des masses atomiques constituantes de la molécule.

Par exemple, la masse moléculaires de l'alanine ($\text{CH}_3\text{CHCO}_2\text{H}_2\text{NH}_2$), soit $\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_1\text{O}_2 = (3 \times 12,01115) + (7 \times 1,00797) + (1 \times 14,0067) + (2 \times 15,9994) = 89,09474 \text{ Da}$

L'unité de masse (u) est appelée dalton (Da) pour une masse chimique.

La spectrométrie de masse est une technique d'**analyse physico-chimique** permettant de **détecter**, d'**identifier** et de **quantifier** des molécules d'intérêt par **mesure de leur masse**.

Il existe deux modes d'analyses principaux utilisés en routine : **la spectrométrie de masse simple (MS)** qui permet la mesure des masses moléculaires présentes dans le mélange, et **la spectroscopie tandem (MS/MS)** qui permet la mesure des éléments de structure et de séquence pour les protéines et /ou peptides présents dans le mélange.

L'analyse des protéines par spectrométrie de masse est basée sur deux approches, complémentaires : (figure 11)

- **l'approche descendante (Top-down)** qui consiste à analyser les protéines entières et les fragmenter pour avoir une information de séquence.
- **et l'approche ascendante (Bottom-up)** : les protéines sont identifiées par analyse des peptides issus de la digestion enzymatique .

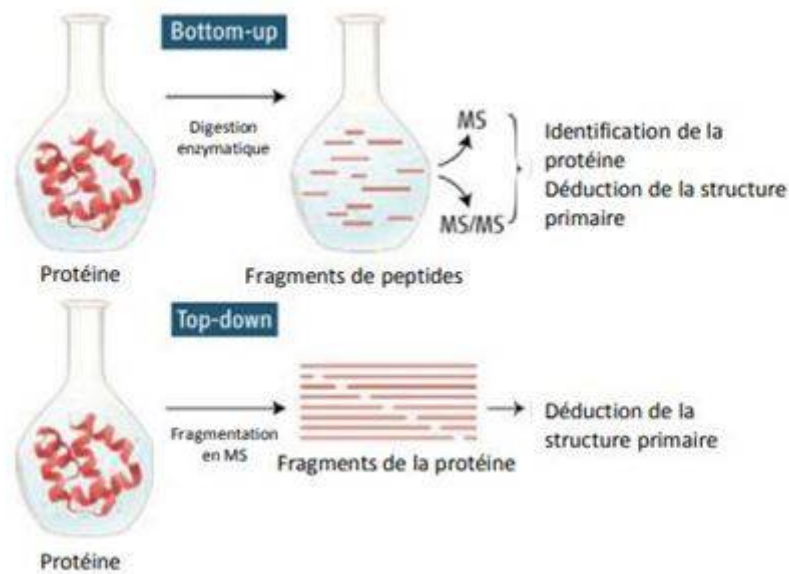


Figure 21: Stratégie top-down et bottom-up. La stratégie top-down part de la protéine intacte pour arriver aux fragments peptidiques. La stratégie bottom-up part quant à elle aux peptides pour arriver aux protéines [19].

L'imagerie par spectrométrie de masse est une technique analytique permettant la « cartographie » de la surface d'une coupe biologique par enregistrement de spectres de masse successifs : à chaque point de la coupe de coordonnées (x, y) correspond un spectre de masse (intensité des ions en fonction de leur rapport m/z).

Après traitement informatique des données, des « cartes de densité ionique » appelées images peuvent être reconstruites pour les différents pics d'intérêt biologique, permettant ainsi leur localisation spatiale sur l'échantillon analysé

b. Indication de la spectrométrie de masse en pathologie rénale :

La principale indication est l'étude de l'amylose pour caractériser le spectre des dépôts amyloïdes et déterminer le type de la protéine amyloïde précurseur sur extrait de tissu rénal.

C. Biologie moléculaire :

Les techniques de biologie moléculaires permettent l'étude ciblée d'expression génique ou des études larges « omiques » intéressant l'ensemble des transcrits (transcriptomique), des protéines (protéomique) ou des métabolites (métabolomique).

En pathologie rénale, ces techniques sont utilisées pour la recherche translationnelle ou en routine pour l'étude des biopsies rénales.

L'extraction des acides nucléiques peut se faire à partir de prélèvements tissulaires frais et congelés non fixés, et aussi à partir de prélèvements fixés en formol et inclus en paraffine.

1. Réaction en chaîne par polymérase PCR : [20]

1.a. PCR classique/ conventionnelle :

❖ Principe :

La réaction en chaîne par polymérase ou PCR est une technique d'amplification *in vitro*, du matériel génétique cellulaire.

Elle permet d'obtenir une quantité importante d'un fragment d'ADN spécifique d'une longueur définie à l'aide d'une enzyme d'ADN polymérase, cette enzyme synthétise une séquence complémentaire d'ADN, à partir d'un fragment d'amorce (primers).

Les fragments d'amorces limitent la séquence à répliquer.

Chaque réaction mis en œuvre deux amorces, chacune d'elle est connectée à l'un des brins d'ADN dans le site spécifique choisi pour démarrer la synthèse d'un nouveau brin d'ADN, à partir des nucléotides présentes dans la réaction.

Cette amplification est répétée un certain nombre de fois, pour obtenir une quantité suffisante pour être détectée et analysée ensuite à l'électrophorèse.

Chaque cycle se déroule en trois étapes :

- **La dénaturation** : elle s'effectue à 95°C ce qui permet de casser les liaisons hydrogènes et dissocie le double brin d'ADN.
- **L'hybridation** : elle s'effectue à 45-60°C ; à cette étape les amorces vont se fixer sur les simples brins d'ADN.
- **La polymérisation / élongation** d'ADN à partir des amorces par l'association des nucléotides de la réaction.

1.b. PCR en temps réel ou quantitative :

La technique de PCR classique a été longtemps utilisée en routine par les laboratoires de biologie pour identifier les micro-organismes pathogènes mais, comme nous l'avons vu précédemment, cette technique nécessite plusieurs étapes expérimentales, complexes, difficiles et requièrent les mêmes délais, voire même des délais supérieurs à ceux des méthodes de diagnostic conventionnelles, en plus les risques de contamination.

Cependant, il existe une autre technique inspirée de la PCR classique, qui permet à la fois la réaction PCR et la détection du produit amplifié, à partir d'un seul mélange réactionnel.

❖ Principe :

La PCR en temps réel permet la quantification précise des acides nucléiques, avec une grande précision

Elle offre une analyse rapide, une grande reproductibilité, avec un faible risque de contamination.

La PCR en temps réel utilise soit des intercalants SYBR®Green, soit elle fait appel à des amorces spécifiques du gène à amplifier associées à un système de sondes fluorescentes qui se fixent spécifiquement sur le brin à amplifier.

On distingue trois grands types de sondes :

- Les sondes d'hydrolyse TaqMan ®
- Les sondes d'hybridation FRET (fluorescent Resonance Energy Transfert)
- Les « molecular beacons » (balises moléculaires)

En fin de chaque cycle d'élongation, on mesure la fluorescence pour construire une courbe, présentent l'algorithme de la fluorescence en fonction du nombre de cycle

1.c. Reverse transcriptase RT-PCR in situ : [21]

La RT- PCR est une technique puissante, très sensible qui permet de quantifier rapidement des quantités infimes d'ARNm cibles en déterminant le nombre d'amplicons après chaque cycle de PCR.

Elle se déroule en deux étapes :

- Une première phase correspond à la copie d'ARN messenger en ADN. L'ARNm est repéré grâce à une sonde oligo-nucléotidique spécifique, puis la transcriptase inverse permet la synthèse du brin complémentaire sous forme d'ADN simple brin, puis l'amorce 2 permettra la synthèse du second brin par extension.
- La deuxième étape correspond à une réaction PCR classique sur l'ADN synthétisé.

1.d. Indications en pathologie rénal :

Diadnostic sur liquide de virus comme (CMV, VIH, VHC), et chez le transplanté rénal (le virus BK)

1. Microarrays / Puces à ADN : [22,23]

a. Principe :

La Puces à ADN est une technique de biologie moléculaire qui permet l'analyse du **transcriptome**, (ARNm exprimés dans un tissu donné à un moment précis). L'observation simultanée de l'expression de plusieurs milliers de gènes dans une cellule ou un tissu donné, mesurant ainsi les modifications des différents états cellulaires.

L'analyse par **puces à ADN** est basée sur le principe de l'hybridation génomique comparative (CGH) et consiste à cohybrider une même quantité d'ADN d'un patient et d'un témoin contrôle, marqués chacun par un fluorochrome de couleur différente, sur un réseau de séquences d'ADN (puce à ADN) représentant l'entier du génome.

La lecture des signaux fluorescents est réalisée grâce à un scanner laser automatisé.

Une analyse bioinformatique des données est ensuite effectuée à l'aide d'un logiciel qui enregistre l'intensité des différentes fluorescences. Après normalisation de ces données, un rapport sous forme de représentation graphique est effectué à l'aide d'un logiciel, les rapports d'hybridation étant proches de «0» pour toutes les régions sans anomalie structurelle.

Une déviation significative de cette valeur sur plusieurs signaux d'une même région génomique suggère la présence d'anomalies, perte ou gain d'ADN.

Marquages des ADN
(fluorochromes de couleurs différentes)

Co-hybridation sur puce à ADN (lame de microscope avec des fragments d'ADN immobilisés)

Lecture des fluorescences
(scanner)

Extraction des rapports de fluorescence

Analyse des profils
Profils moléculaires des anomalies génomiques

Interprétation

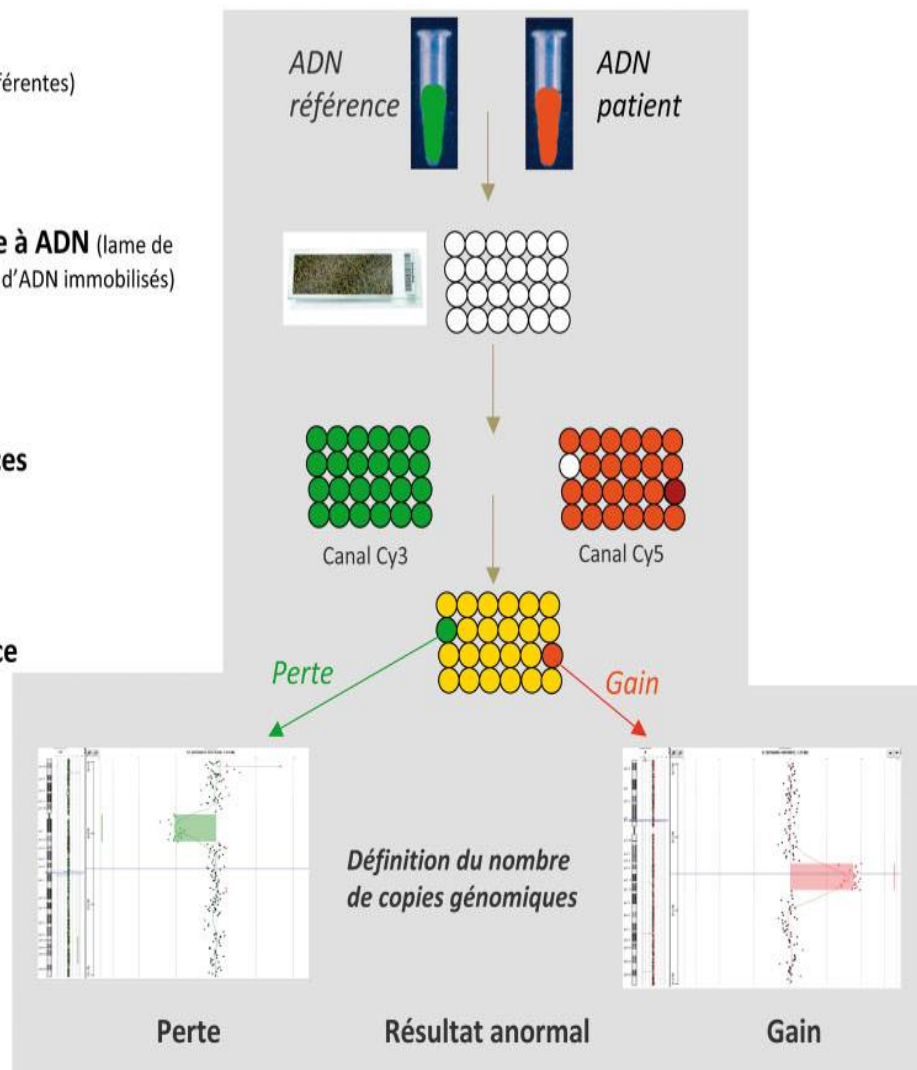


Figure 22: les étapes d'analyse d'ADN par la technique de Microarrays (Puce à ADN) [22].

b. Indication en pathologie rénale de la technique microarrays /puces à ADN:

- Elle permet la quantification virale.
- Elle permet la mesure de l'expression des gènes, dans certaines conditions (maladie, traitement...).
- Depuis la conférence de Banff 2007, des recherches ont été réalisées pour connaître la place des études microarrays (puces à ADN) dans le diagnostic du rejet humoral et cellulaire comme complications majeures de la transplantation rénale. Récemment, le score ABMR a été mis au point pour le diagnostic du rejet humoral avec une bonne corrélation au diagnostic histologique et sérologique. Philip F Halloran et al ont démontré une corrélation entre la variation de certains transcrits et la présence de lésions histologiques de rejet humoral.

Le rejet médié par les anticorps (ABMR) est la principale cause d'échec de la transplantation rénale, mais l'évaluation conventionnelle de l'ABMR est problématique. L'ABMR a été identifié pour la première fois sur la base de lésions de microcirculation et d'anticorps spécifiques au donneur (DSA) en circulation, et s'est révélé plus tard associé à une immunocoloration pour le facteur C4d du complément. Le diagnostic dépend de trois caractéristiques: lésions histologiques, coloration au C4d et DSA, chacune avec ses propres limites [24].

L'évaluation histologique a une faible reproductibilité, comme le montre le faible accord entre les observateurs, et repose sur des lésions non spécifiques (modifications de la microcirculation, fibrose, épaissement intimal fibreux artériel) qui se produisent également dans d'autres conditions telles que le rejet induit par les cellules T (TCMR) et la glomérulonéphrite (GN).

PF Halloran et AB Pereira ont développé un test basé sur un microarray pour l'ABMR dans une étude prospective de 315 patients subissant 403 biopsies. Pour attribuer des diagnostics conventionnels en l'absence d'un étalon-or, ils ont d'abord créé un étalon de référence de diagnostic pour interpréter les caractéristiques conventionnelles. À l'aide des

étiquettes de référence standard, ils ont développé des classificateurs basés sur des mesures de microarray pour attribuer un score ABMR entre 0 et 1,0 à chaque biopsie, avec un seuil arbitraire de 0,2 sélectionné comme positif. Les gènes sélectionnés par l'algorithme classificateur étaient principalement endothéliaux, et certains reflétant les effets de l'interféron- γ et les cellules NK. Le score ABMR était corrélé à la présence de DSA et de lésions de microcirculation, au diagnostic de référence standard de l'ABMR et à la survie du greffon [24].

2. Séquençage de nouvelle génération (NGS) : [25,26]

a. Principe :

Le séquençage de nouvelle génération ou le séquençage à haut débit est un ensemble de méthode de séquençage moderne comme :

- Illumina® (Solexa)
- Roche 454
- Ion torrent: Proton / PGM
- SOLiD

Elles permettent de séquencer un nombre colossal de nucléotides (jusqu'à 10^{12} nucléotides séquencés par expérience) en un temps rapide.

Elles permettent soit de viser à analyser l'ensemble du génome, mais également cibler un panel de gènes à choix, qui vont être sélectionné au préalable afin de limiter les découvertes aspécifiques et le temps d'analyse.

Ces méthodes sont parallélisées : des millions de réactions ont lieu en même temps dans des barrettes qui contiennent des puits minuscules en fibre optique.

Elles permettent de mettre en évidence de nouvelles mutations inconnus jusqu'au lors.

Cette analyse génomique nécessite l'accès à trois ressources sans lesquelles les séquences seules n'ont aucun intérêt pour le clinicien : le support bioinformatique, l'accès à une base de données de variant exhaustive et l'analyse de variant d'étiologie inconnue *in silico* (programmes informatiques de prédiction de pathogénicité) ou fonctionnellement dans d'autres modèles.

Les techniques de NGS présentent 3 étapes communes :

- **La préparation de banques** : les banques sont créées en utilisant une fragmentation aléatoire de l'ADN suivie de la liaison avec des petites séquences spécifiques
- **L'amplification** : la banque est amplifiée grâce à des méthodes d'amplification clonale et de PCR
- **Le séquençage** : l'ADN est séquencé en utilisant différentes approches en fonction de la technologie utilisée.

La technique la plus utilisée est la technique Illumina®, elle permet l'amplification clonale et le séquençage d'ADN par synthèse(SBS)

Le processus permet d'identifier simultanément les bases d'ADN lorsqu'elles sont incorporées dans la chaîne d'acide nucléique. Chaque base émet un signal de fluorescence unique lorsqu'elle est ajoutée au brin en cours de synthèse, ceci est utilisé pour déterminer la séquence d'ADN.

b. Applications en pathologie rénale :

- Etude du développement rénal
- La compréhension des mécanismes pathogéniques des maladies rénales
- Etude de la néphropathie diabétique
- La découverte des mutations rares, et donc le diagnostic des maladies rénales héréditaires (néphronophtise ; CAKUT (Congenital anomalies of kidney and urinary tract)).



LECTURE DES LAMES

VII. LECTURE DES LAMES :

Les différentes techniques sus décrites (microscopie optique, immunohistochimie, microscopie électronique) sont indispensables à une lecture optimale et complète d'une biopsie rénale.

1. Microscopie optique :

Une bonne analyse morphologique exige une bonne fixation.

Si la fixation est retardée et imparfaite, elle ne peut être améliorée ultérieurement.

Une fixation trop prolongée sera responsable d'une altération majeure de l'épithélium tubulaire.

Il est important d'éviter le dessèchement du fragment avant la fixation.

Des coupes fines ne dépassant pas 2 à 3 microns sont nécessaires pour une analyse correcte de la cellularité glomérulaire et des anomalies de la membrane basale glomérulaire.

Pour l'analyse des différentes structures du glomérule rénal normal et pathologique, il est nécessaire que les composants de la matrice extracellulaire (membrane basale, matrice mésangiale...) soient bien caractérisés.

Le tableau n° III : indique les caractéristiques tinctoriales des structures normales et anormales du rein, sur des coupes provenant de fragments fixés et inclus en paraffine.

Le tableau n° IV : indique les performances de chaque coloration utilisée pour l'étude en MO de la biopsie rénale.

La coloration par l'hématoxyline éosine n'est pas suffisante pour distinguer clairement la matrice extracellulaire du cytoplasme de la cellule.

Les colorations PAS, Jones, Trichrome de Masson permettent une meilleure définition de la matrice extracellulaire.

Chaque coloration a ses avantages et ses inconvénients, mais elles sont toutes employées pour l'analyse optimale de la biopsie rénale.

Le PAS colore la membrane basale glomérulaire, la matrice mésangiale et la membrane basale tubulaire en rouge (positive), alors que le réactif JONES colore les mêmes structures en noir, et permet un bon contraste entre les structures de coloration positive et négative.

Le Trichrome Masson colore la matrice extracellulaire et la membrane basale en bleu ou en vert, ce qui permet de distinguer nettement les cellules et le matériel accumulé dans les conditions pathologiques.

Tableau III : Caractéristiques tinctoriales des structures normales et anormales du rein, sur des coupes provenant des fragments fixés et inclus en paraffine.

	Colorations		
	PAS	JONES	Trichrome de Masson
Membrane basale	Rouge	Noire	Bleue ou verte
Matrice mésangiale	Rouge	Noire- marron	Verte
Collagène du tissu interstitiel	Rose	Négative	Bleu pâle
Cytoplasme cellulaire	Rose	Négative	Rose violacé
Dépôts de complexe immuns	Négatifs ou légèrement positifs	Négatifs (argyrophobes)	Rouge –orange brillants
Fibrine	Légèrement positive	Rose (Négative)	Rouge intense
Protéines plasmatiques (intra ou extra cellulaires)	Légèrement positives	Négatives	Rouge-Orange
Dépôts amyloïdes	négatifs	Négatifs	Vert pâle ou bleu pâle
Cylindres tubulaires (protéine de Tamm-Horsfall)	Rouges	Gris ou noirs	Vert ou bleu pâle
Noyau	Violet	Rouge	Violet

Tableau IV : comparaison de l'apport des 4 principales colorations systématiques à l'analyse des structures du parenchyme rénal normal et pathologique

	PAS	Trichrome de Masson	JONES	HE
La cellularité	Excellent	Pauvre	Pauvre	excellent
Matrice mésangiale	Excellent	Variable	Excellent	pauvre
Sclérose glomérulaire	Excellent	Excellent	Bien	pauvre
Dépôts immuns	Pauvre	Variable	Négatif	pauvre
Membrane basale	Excellent	Bien	Excellent	pauvre
Fibrose	Pauvre	Excellent	Excellent	pauvre
Hyalinose vasculaire	Pauvre	Bien	Négative	Bien
Thrombi	Pauvre	Bien	Variable	Bien

Autres colorations spéciales :

➤ **Rouge Congo : [27]**

En 1922, l'affinité du rouge Congo pour l'amylose fut rapportée pour la première fois par Bennhold. Le rouge Congo colore en **rouge brique** ou **rose** les **dépôts amyloïdes** observés en **lumière photonique** (Microscope optique ordinaire).

Ce colorant était utilisé dans l'industrie textile et pour la coloration du papier, plastique etc. Son appellation est en rapport avec des considérations « marketing » et n'a aucun rapport avec son origine géographique.

L'amyloïde est une structure homogène et apte à être colorée de manière éosinophile, constituée de fibrilles protéiques (8 - 15 nm de diamètre chacune), qui se dépose entre les cellules, par exemple dans le cas de l'amylose. Tous les dépôts d'amyloïdes contiennent des fibrilles protéiques analogues qui résistent aux mécanismes de défense immunitaire de l'organisme et ne peuvent plus être enlevées.

L'événement clé dans le développement de l'amylose AL est le changement dans la structure secondaire ou tertiaire d'une chaîne légère monoclonale anormale, ce qui entraîne une conformation instable. Ce changement de conformation est responsable du plissement anormal de la chaîne légère, riche en feuilles β , qui s'assemblent en monomères qui s'empilent pour former des fibrilles amyloïdes.

Le complexe rouge du Congo fibrille amyloïde présente une biréfringence jaune-verte en raison de l'alignement parallèle des molécules de colorant le long de feuillet plissée β .

La coloration au rouge Congo fonctionne sur la base de liaisons hydrogènes au composant d'hydrate de carbone du substrat. Le rouge Congo est un colorant anionique pouvant se déposer dans les fibrilles amyloïdes qui présentent ainsi un dichroïsme visible dans la lumière polarisée. Le tissu coloré au rouge Congo apparaît en rouge orangé à la lumière transmise mais à la lumière polarisée les dépôts amyloïdes se présentent comme une biréfringence en jaune vert vif sur fond sombre

La biréfringence est la propriété optique d'un matériau ayant un indice de réfraction qui dépend de la polarisation et de la direction de propagation de la lumière, il est responsable d'un phénomène de double réfraction par lequel un rayon de lumière, lorsqu'il est incident sur un matériau biréfringent, est divisé par polarisation en 2 rayons prenant des chemins légèrement différents.

*** Remarques techniques :**

La coloration peut être difficile du point de vue technique si les coupes de paraffine utilisées sont trop fines ou si le tissu est coloré trop fortement.

La coloration peut avant tout s'avérer difficile du point de vue technique si des coupes de paraffine de moins de 5 μm sont utilisées, puisqu'il n'y a plus assez d'amyloïde pour intercaler le rouge Congo. Ceci peut fournir des résultats faussement négatifs. Il conviendrait donc de colorer des coupes de paraffine de 5 à 8 μm .

En cas d'incubation trop intensive à l'éthanol pour la déshydratation, il se peut que le colorant rouge Congo disparaisse du tissu au lavage et que la préparation soit décolorée. Les temps de déshydratation devraient être respectés avec précision pour éviter les résultats faussement négatifs. [Fiche technique annexe I]

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux et comporter un équipement de polarisation. En cas d'utilisation des processeurs d'histologie ou des automates de coloration, se conformer aux instructions du fabricant de l'appareil et du logiciel.

Un analyseur clinique commun a un filtre polarisant avec un compensateur intégré qui ajoute généralement de la couleur et est souvent utilisé pour l'examen des cristaux. L'utilisation d'un tel analyseur pour examiner des échantillons colorés au Congo conduit fréquemment à un champ excessivement lumineux et oblige parfois l'observateur à décroiser partiellement l'analyseur afin d'accentuer la biréfringence vert pomme. Cependant, cela se traduit par l'apparition ou l'amélioration d'une teinte vert bleuâtre principalement due au collagène et à d'autres protéines de la matrice.

*** Interprétation :**

La rotation de la lame ou du filtre polarisant est importante pour visualiser la biréfringence, L'orientation des fibrilles amyloïdes colorées au rouge Congo par rapport au plan du trajet lumineux peut altérer la détection.

La figure 29 montre des échantillons imagés, puis ré-imaginés après rotation de la platine. Il est évident que la biréfringence vert pomme ne peut être vue que sous un angle. Cela met en évidence la nécessité d'utiliser une platine circulaire mécanique, introuvable sur les microscopes cliniques.

Les éléments tissulaires tels que le collagène, l'élastine et d'autres peuvent afficher une biréfringence de couleurs variables qui peuvent être mal interprétées comme amyloïdes (Ne confondez pas le bleu-vert du collagène avec le vert citron de l'amyloïde).

Pour identifier l'amyloïde avec certitude, il faut toujours effectuer une vérification à la lumière polarisée pour confirmer le résultat obtenu en lumière transmise.

Comme on sait que le rouge Congo peut être fluorescent, Jessica S. Hoane et Crystal L. Johnson ont comparé la fluorescence obtenus après une coloration en rouge Congo et HE, examiné avec un microscope fluorescent en utilisant un filtre rouge Texas (figure 30) .Les dépôts amyloïdes colorés à HE ne présentent pas d'autofluorescence mais sont autofluorescents lorsqu'ils sont coloré au rouge Congo [28].

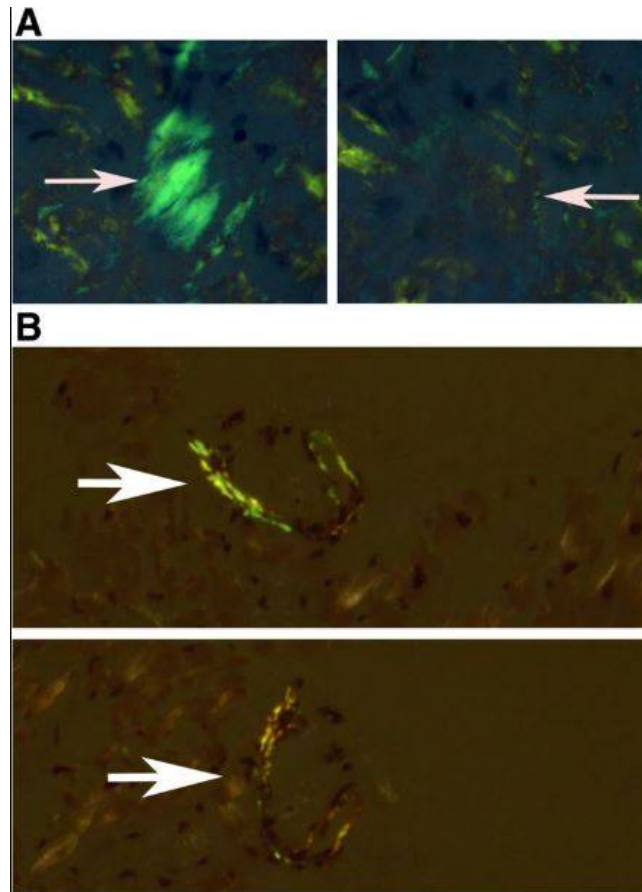


Figure 23: un échantillon imagé puis re-imagés après rotation de la scène. 3A a tourné à 45 degrés et 3b a tourné à 60 degrés. La biréfringence verte n'est plus visible comme indiqué par les flèches [27].

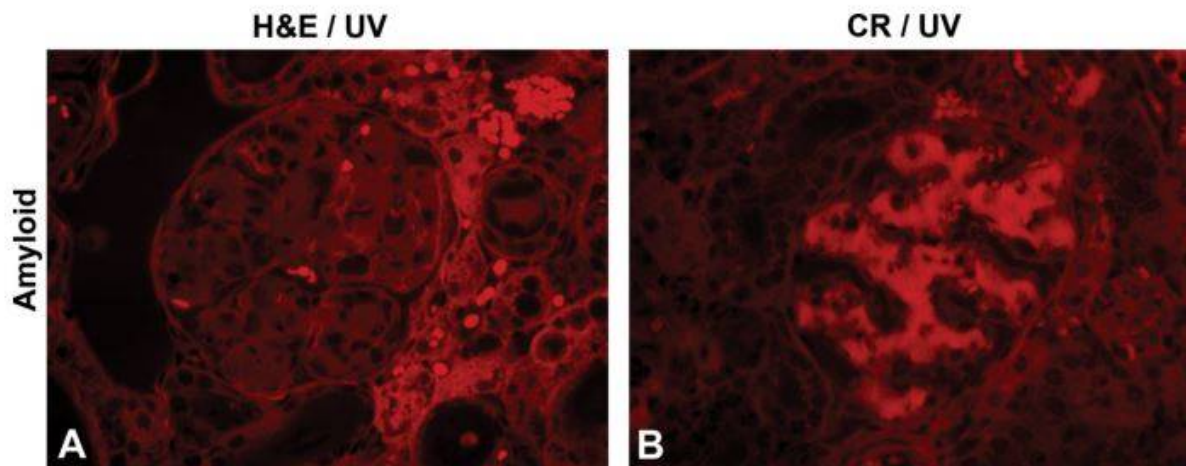


Figure 24:Évaluation aux ultraviolets (UV) de la glomérulopathie amyloïde spontanée (A et B) à fort grossissement (filtres Texas rouges) [28].

2. Immunofluorescence :

Les lames sont observées au microscope à épifluorescence, ce microscope permet de visualiser des objets qui sont naturellement fluorescents (chlorophylle...), ou des molécules rendues fluorescentes pour mieux les observer.

L'échantillon est éclairé avec une lumière d'une longueur d'onde spécifique. Cette lumière est absorbée par les fluorophores, ce qui les amène à émettre une lumière de plus grande longueur d'onde (c'est-à-dire d'une couleur différente de celle de la lumière absorbée). La lumière d'illumination est séparée de la fluorescence émise, beaucoup plus faible, par l'utilisation d'un filtre d'émission spectrale.

Un filtre dichroïque ou filtre à couche mince, est un filtre coloré très précis utilisé pour faire passer sélectivement la lumière d'une petite gamme de couleurs tout en réfléchissant d'autres couleurs.

Les composants typiques d'un microscope à fluorescence sont une source de lumière (lampe à arc au xénon ou lampe à vapeur de mercure ou LED et lasers haute puissance), le filtre d'excitation, le miroir dichroïque et le filtre d'émission [29].

Un fluorophore est un composé chimique fluorescent qui peut réémettre de la lumière en cas d'excitation lumineuse. Les fluorophores contiennent généralement plusieurs groupes aromatiques combinés, ou des molécules planes ou cycliques avec plusieurs liaisons π . Parmi les fluorophores les plus utilisés en microscope fluorescence sont la fluorescéine, rhodamine le DAPI, Proidium iodide, Green fluorescent protein (GFP) et Red Texas [29].

Le photoblanchiment est la décomposition irréversible des molécules fluorescentes à l'état excité en raison de leur interaction avec les molécules d'oxygène avant le processus d'émission. Plusieurs facteurs pouvant affecter l'intensité de la fluorescence et entraîner une décoloration, photoblanchiment ou trempe, notamment la réactivité chimique du fluorochrome, l'environnement chimique intracellulaire, l'intensité et la longueur d'onde de la lumière d'excitation. Certains colorants fluorescents sont facilement sensible au photoblanchiment tandis que d'autres sont relativement stable. Le phénomène de photoblanchiment peut être minimisé en réduisant le temps d'exposition ou en diminuant l'énergie d'excitation (intensité de la lampe), des filtres de densité neutre peuvent être insérés, dans le trajet de la lumière

avant qu'il n'atteigne le filtre d'excitation, diminuant ainsi l'intensité de la lumière. Cependant, l'utilisation de ces mesures pourra affecter la qualité de l'émission du fluorophore. Le phénomène de décoloration peut être réduit, dans certains cas, en modifiant le PH du milieu de montage, ou par augmenter la concentration du fluorophore [30].

La fluorescence spécifique se présente sous forme d'une coloration vert clair d'une intensité variable notée comme suit : 1+ (faible), 2+ (moyenne), 3+ (forte), 4+(brillante).

Toute fluorescence d'une intensité inférieure à 1+ est considérée comme négative.

Les colorations jaunâtres ou vert foncé doivent être ignorées, car elles sont le résultat des réactions non-spécifiques.

Devant toute fluorescence anormale, le pathologiste doit préciser :

1)- la nature des dépôts :

Quels antisérums positifs ? (IgA, IgG, IgM, C1q, C3, fibrinogène, albumine)

Les chaînes légères kappa, lambda ou autre protéine spécifique.

Il est important de déterminer la classe d'Ig, car elles peuvent être en corrélation avec une maladie spécifique.

2)- localisation :

Le pathologiste doit décrire la distribution de la fluorescence sur la lame, par rapport aux différentes structures rénales (par exemple au niveau du glomérule, tubulo-interstitielle et / ou vaisseaux sanguins).

En cas de localisation glomérulaire, il faut préciser la région exacte (paroi capillaire, mésangiale, podocyte..).

3)-Intensité notée de (1 à4 +).

4)- Répartition :

Il faut décrire la répartition de la fluorescence :

- Segmentaire/globale
- Focale / diffuse

5)-Aspects :

- Granuleux,

-Linéaire : le long de la membrane basale glomérulaire, voire extra-glomérulaire

-En flaque :

- Fibrine + (nécrose, thrombose)
- IgM + C1q/C3 + (hyalinose, sclérose)
- Immunoglobulines variées intra-capillaires
- Cylindres tubulaires (positifs en IgA)

2-1 Les lésions fluorescentes non significatives :

- Grains isolés de C3 ou d'Ig M (voir C1q, d'IgA) dans le mésangium, la capsule, les parois vasculaires.
- Dépôts de C3 en coup d'ongles le long des vitrées tubulaires.
- Réseau membranaire (glomérulaire+ tubulaire) et capsule de Bowman visibles avec le sérum anti-fibrine.

2-2 Les lésions fluorescentes mais non spécifiques :

- Gouttelettes de résorption protéique dans les podocytes et dans l'épithélium tubulaire (IgA, IgG, albumine), témoin d'une protéinurie abondante.
- Cylindres hyalins positifs en IgA dans les tubes.
- Trappage d'Ig M/ C3/C1q dans les lésions segmentaires fibro-hyalines (glomérules, vaisseaux)

2-3 Les Lésions fluorescentes évocatrices d'une glomérulopathie :

➤ GP à dépôts mésangiaux d'IgA :

Les dépôts d'Ig A sont diagnostiqués par l'IF. Un seul glomérule suffit au diagnostic puisque les lésions sont identiques à tous les glomérules.

Les dépôts d'Ig A se présentent sous forme d'une fluorescence diffuse, globale, dominante ou codominante, au niveau des axes mésangiaux réalisant ainsi l'aspect typique « *en arbre mort* » parfois segmentaire ne touchant que quelques axes « *en coup d'ongle* ». La taille et l'intensité sont variables selon les biopsies, non proportionnelle aux lésions de MO.

Des débordements en sous-endothéliale sont possibles, notamment quand il existe une prolifération endocapillaire ou au cours d'un purpura rhumatoïde. Les dépôts d'IgA peuvent disparaître au stade de glomérules transformés en pains à cacheter. Ils sont accompagnés de dépôts de C3, et de dépôts d'IgM dans 50% des cas. Les chaînes légères kappa et lambda sont souvent concomitantes, lambda légèrement plus fréquente.

La fibrine est surtout retrouvée au cours du purpura rhumatoïde.

En cas de haylinose, des dépôts sous membraneux segmentaires d'Ig M et de facteurs de complément peuvent s'ajouter, ainsi que des dépôts de fibrine en cas de foyers nécrotiques [3].

➤ **Glomérulonéphrite Lupique : [3]**

Les dépôts dans les néphropathies lupiques, sont d'aspect variable, souvent granuleux, parfois massif ou plus rarement pseudo-linéaire étendu de l'aire mésangiale à la paroi capillaire.

La composition des dépôts est souvent évocatrice du diagnostic par la présence de l'ensemble des classes d'Ig (IgA, IgG, IgM, C3, C1q du complément). Les Ig G sont les plus présentés avec prédominance d'IgG1 et d'IgG3. Les dépôts de C4d sont exceptionnels.

Les dépôts de fibrinogène sont trouvés dans les foyers de nécrose segmentaire ou dans les croissants cellulaires.

Les glomérulopathies mésangiales lupique (classe I et II) présentent des dépôts d'intensité variable avec assez souvent une restriction des dépôts aux Ig G et une absence possible de c1q. Les dépôts d'Ig A sont moins représentés que les dépôts d'IgG.

Les glomérulopathies proliférantes, présentent des dépôts diffus, endomembraneux souvent étendus à l'ensemble des parois capillaires permettant de retrouver l'aspect en Wire loops décrits lors de l'examen en MO.

Les précipitations d'Ig agrégés intracapillaires sont également bien visualisées sous la forme de véritable thrombi ou « bouchons d'Ig » non marqués par la fibrine.

Certains auteurs ont souligné que les glomérulopathies proliférantes de classe III ou IV ont moins de dépôts périphériques et avec la présence de dépôts mésangiaux abondants de C3.

Les glomérulopathies extramembraneuses (classes V) présentent un aspect classique en « collier de perles », avec présence de C1q et des dépôts mésangiaux pouvant orienter vers le diagnostic de néphropathie lupique en l'absence de contexte évocateur.

En dehors des glomérules, les dépôts sont parfois identifiés au niveau des membranes basales tubulaires et des parois vasculaires notamment des artérioles pré glomérulaires. Il est possible d'observer directement le marquage des noyaux signant la présence de facteurs antinucléaires

➤ **GP aigue post infectieuse :**

Dans la glomérulonéphrite aigue post infectieuse, les dépôts sont fins granuleux de distribution diffuse situés le long des capillaires glomérulaires et dans le mésangium donnant un aspect de « ciel étoilé ». Ils sont faits de C3 ou de C3 et d'IgG [11].

➤ **Glomérulonéphrite membrano-proliférative (GNMP) :**

La glomérulonéphrite membranoproliférative se manifeste par des dépôts endomembraneux mésangiaux et pariétaux de C3 associé de façon variable à l'Ig G, Ig M et Ig A.

Il existe deux types GNMP en fonction de la composition et de la localisation des dépôts :

Type I : des dépôts granulaires de C3, Ig G et Ig M.

Type II : caractérisé par un « dépôt dense », intra membraneux, au sein de toute les basales du rein, de C3.

➤ **Glomérulonéphrite extra membraneuse :**

La glomérulonéphrite extra membraneuse se définit par un dépôt granuleux pariétal généralement faits d'Ig G parfois associé au C3.

➤ **GP de type Hyalinose segmentaire et focale :**

En IF, la distribution des dépôts est aussi segmentaire et focale. Les dépôts d'Ig M et de C3, plus inconstamment de C1q et C4 sont retrouvés en plaques sur les surfaces lésées.

En l'absence de glomérules, l'IF retrouve parfois des dépôts extra-glomérulaires, ce qui doit faire évoquer les diagnostics de GP Lupique, NP diabétique, amylose, GP à dépôts monotypiques d'Ig.

L'étude des chaînes légères Kappa et Lambda des Ig est généralement systématique, ou proposée plus particulièrement dans certains contextes cliniques (VHC, syndrome lympho et myéloprolifératifs, cryoglobulinémie), et peut suffire pour poser les diagnostics suivants

- Amylose AL
- GP cryoglobulinémique
- GP à dépôts monotypiques d'Ig

Dans tous les cas, la confrontation aux données cliniques permet de conforter le diagnostic.

2.4. Autres marqueurs utilisés en IF :

× C4D

Le C4D est un sous produit de fraction issu de l'activation de la voie lectine et la voie classique du complément.

Il est utilisé comme marqueur du rejet des allogreffes rénales médié par les anticorps.

Il permet aussi de distinguer les glomérulopathies à C3 et les GN post infectieuses (la recherche de C4D est positive dans les GN médiées par les complexes immuns à l'exception de la néphropathie à IgA et négative pour les glomérulopathies à C3)[31].

× Les chaînes alpha du collagène : apport au diagnostic du syndrome d'Alport

Le syndrome d'Alport (SA) ou néphrite héréditaire est une maladie génétique caractérisé par l'association d'une néphropathie hématurique progressive évoluant vers l'insuffisance rénale terminal, une surdité de perception et parfois une anomalie oculaire.

C'est une maladie du collagène IV, principal constituant des membranes basales, liée à des mutations dans les gènes codant l'une des trois chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ ou $\alpha 5$ (IV), exprimées dans la membrane basale glomérulaire. Il existe six isotypes différents, codés par six gènes arrangés deux par deux sur trois chromosomes : les gènes COL4A1-COL4A2 (chromosome 13) codant les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$, COL4A3-COL4A4 (chromosome 2) codant $\alpha 3$ et $\alpha 4$ et COL4A5-COL4A6 (chromosome X) codant $\alpha 5$ et $\alpha 6$ [32].

Le SA lié à l'X, est dû à des mutations dans le gène codant pour chaîne $\alpha 5$ de COL4 (COL4A5) présente sur le chromosome X, c'est la forme la plus **fréquente**. Les autres cas sont autosomiques récessifs ou autosomiques dominants et sont dus à des mutations dans les gènes codant pour les chaînes $\alpha 3$ (COL4A3) ou $\alpha 4$ (COL4A4) situées sur le chromosome 2.

Les mutations de novo (sporadiques) peuvent être responsables de nouveaux cas qui n'ont pas d'antécédents familiaux de maladie rénale [3].

Il n'existe pas des lésions histologiques spécifiques de la maladie d'Alport à la microscopie optique.

Le COL4 est composé de 6 chaînes α , de $\alpha 1$ à $\alpha 6$ enroulées l'une autour de l'autre pour former des protomères triples hélicoïdales, dont seulement 3 configurations ont été découvertes, $\alpha 1. \alpha 1. \alpha 2. (IV)$, $\alpha 3. \alpha 4. \alpha 5. (IV)$ et $\alpha 5. \alpha 5. \alpha 6. (IV)$. Les protomères triples hélicoïdales forment des hexamères, dont il n'existe que 3 paires: $\alpha 1. \alpha 1. \alpha 2. (IV) - \alpha 1. \alpha 1. \alpha 2. (IV)$, $\alpha 3. \alpha 4. \alpha 5. (IV) - \alpha 3. \alpha 4. \alpha 5. (IV)$, et $\alpha 1. \alpha 1. \alpha 2. (IV) - \alpha 5. \alpha 5. \alpha 6. (IV)$.

Le réseau collagénique $\alpha 3. \alpha 4. \alpha 5. (IV) - \alpha 3. \alpha 4. \alpha 5. (IV)$ est présent dans la MBG, **la capsule de Bowman** et la membrane basale des tubes distaux. Le réseau $\alpha 1. \alpha 1. \alpha 2. (IV) - \alpha 5. \alpha 5. \alpha 6. (IV)$ dans la capsule de Bowman, la MB des tubes collecteurs et MB dermo-épidermique. Le réseau ubiquitaire $\alpha 1. \alpha 1. \alpha 2. (IV) - \alpha 1. \alpha 1. \alpha 2. (IV)$ est présent dans la matrice mésangiale et dans toutes les MB extraglomérulaires. Dans la MBG, il est minoritaire et localisé dans la zone sous-endothéliale.

En raison de la grande taille des gènes COL4 et des nombreuses mutations pathogènes identifiées jusqu'à présent (1900 variantes du gène COL4A5), L'étude de l'expression des chaînes de collagène dans les membranes basales cutanées et rénales est devenue un complément utile pour faire le diagnostic et établir le mode de transmission chez la majorité des patients.

Chez environ deux tiers des malades, cette distribution est anormale : la chaîne $\alpha 5$ (IV), mais également les chaînes $\alpha 3$ - $\alpha 4$ (IV) et $\alpha 6$ (IV), sont absentes des membranes basales rénales (et dermo-épidermiques chez les sujets de sexe masculin, tandis que leur distribution est discontinue chez les femmes. Ces constatations ont fait suggérer qu'une anomalie de conformation de la chaîne $\alpha 5$ du collagène IV peut empêcher l'intégration normale des chaînes $\alpha 3$ -4(IV) et $\alpha 6$ (IV) dans le réseau de collagène IV.

Tandis que dans le SA autosomique récessif quelque soit le sexe, il y a une absence des chaînes $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV), $\alpha 5$ (IV) dans la MBG avec la persistance de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ de la CB, la MB du tube collecteur et la MB dermo-epidermique. En revanche, les patients atteints de néphropathie à membrane basale mince ont généralement une distribution normale des sous-unités COL4 le long de la MBG. A savoir que les femmes porteuses de SA ont souvent des MBG minces et peuvent montrer une perte d'expression incomplète avec un aspect en mosaïque [3].

Le tableau n° V montre la localisation des différentes chaînes du COL IV et l'appartenance chromosomique [3].

Tableau V : Chaîne du collagène IV et membranes basales glomérulaires (MBG)[3]

Chaîne du COL IV	LOCALISATION	CHROMOSOME
$\alpha 1$	MBG, mésangium, capsule de Bowman	13q34
$\alpha 2$	MBG, mésangium, capsule de Bowman	13q34
$\alpha 3$	MBG	2q35-q37
$\alpha 4$	MBG	2q35-q37
$\alpha 5$	MBG	Xq22
$\alpha 6$	Capsule de Bowman	Xq22

✘ Les sous- classes des Ig G :

Les immunoglobulines de type G (Ig G) constituent une classe de molécules anticorps. L'immunoglobuline G (Ig G) est l'une des protéines les plus abondantes dans le sérum humain, représentant environ 10 à 20% des protéines plasmatiques.

Chaque Ig G est composée de quatre chaînes de peptides - deux chaînes lourdes γ et deux chaînes légères soit κ (kappa), soit λ (lambda) communes à toutes les classes d'immunoglobulines. Chaque Ig G possède deux sites de liaison à l'antigène. D'autres immunoglobulines peuvent être décrites en termes de polymères dont la structure monomérique serait celle d'une Ig G.

Ces glycoprotéines étroitement apparentées, composées de 82 à 96% de protéines et de 4 à 18% de glucides, diffèrent par la structure des chaînes lourdes et ont différentes fonctions effectrices. Les Ig G peuvent être divisées en quatre sous-classes, nommées, par ordre décroissant d'abondance Ig G1, Ig G2, Ig G3 et Ig G4 1.

Bien qu'elles soient identiques à plus de 90% au niveau des acides aminés, chaque sous-classe a un profil unique en ce qui concerne la liaison à l'antigène, la formation de complexes immuns, l'activation du complément, la liaison au récepteur cellulaire, demi-vie et transport placentaire.

La classification des dépôts immuns contenant l'immunoglobuline Ig G avec les sous-classes d'IgG (Ig G1, Ig G2, Ig G3 et Ig G4) s'est avérée utile pour le diagnostic des maladies glomérulaires [33].

Parmi ces maladies, nous citons la maladie à dépôt de chaînes lourdes et légères d'Ig G et les glomérulonéphrites prolifératives avec dépôts d'Ig G monoclonaux. Elle permet aussi de différencier la glomérulonéphrite extra-membraneuse primaire et secondaire. Les glomérulonéphrites prolifératives avec des dépôts d'IgG polyclonales, présente des Ig G1 dominantes /codominantes associées aux IgG3 et IgG2, et des dépôts faibles ou absents d'Ig G4 ce qui évoque une maladie auto-immune sous-jacente [33].

L'étude des sous-classes d'IgG composant les dépôts immuns dans la glomérulonéphrite extramembraneuse (GEM) permet d'orienter le diagnostic étiologique. Les dépôts d'IgG4 sont le plus souvent vus dans les formes dites primitives, liées à la présence d'auto-anticorps (anticorps dirigé contre le récepteur de la phospholipase A2 [PLA2R] dans la majorité des cas) et ils sont polytypiques avec chaînes légères kappa et lambda. Dans les formes dites secondaires, les dépôts comportent plutôt de l'IgG1, IgG2 et IgG3 [34].

L'étude en IF des sous-classe d'Ig G peut être utile dans les cas de glomérulonéphrite à médiation par complexes immuns chez les patients qui n'ont pas d'antécédent de lupus érythémateux systémique (LED) car les dépôts des Ig G1, Ig G2 et Ig G3 sont évocateurs d'un LED [33].

Dans la glomérulonéphrite cryoglobulinémique, la sous-classe Ig G1 est la plus abondante et joue un rôle dans la génération des réponses immunitaires aux infections virales ; il est donc logique que la coloration prédominante des Ig G1 soit observée dans la glomérulonéphrite cryoglobulinémique où de nombreux cas sont liés à l'infection par le virus de l'hépatite C [33].

Dans l'étude de Jessica. H et al : les 3 cas de maladie à dépôts de chaînes lourdes, ont montré des dépôts monotypiques des Ig G1 (Tableau 1). Ces résultats sont en accord avec les résultats d'autres études qui ont démontré que dans la maladie à dépôts de chaînes lourdes gamma, la gamma 1 est la chaîne lourde d'Ig G la plus fréquemment impliquée, suivie de gamma 4, gamma 3 et gamma 2.

La majorité des cas de glomérulonéphrites prolifératives avec dépôts d'Ig G monoclonales présente des IgG3 et moins fréquemment d'Ig G1 et plus rarement d'IgG2. Pour les chaînes légères d'Ig, kappa est plus fréquente que lambda [33].

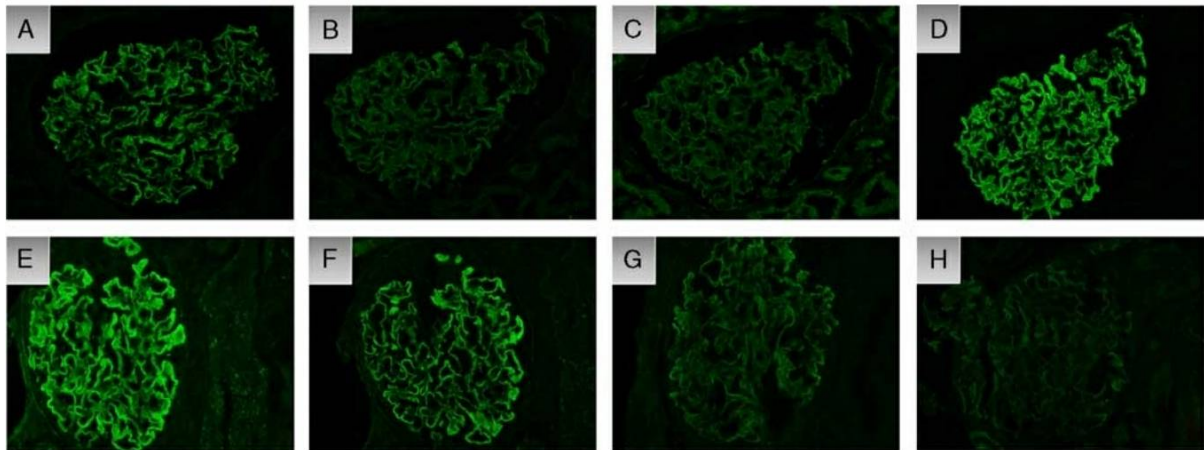


Figure 25: L' étude des sous-classes d' Ig G est utile pour différencier la GN extra-membraneuse primaire (généralement avec des dépôts de sous-type IgG4) (A-D) de la GN extra-membraneuse secondaire (généralement avec des dépôts dominants d' IgG1) (E-H). IgG1 (A et E), IgG2 (B et F), IgG3 (C et G), IgG4 (D et H) [33].

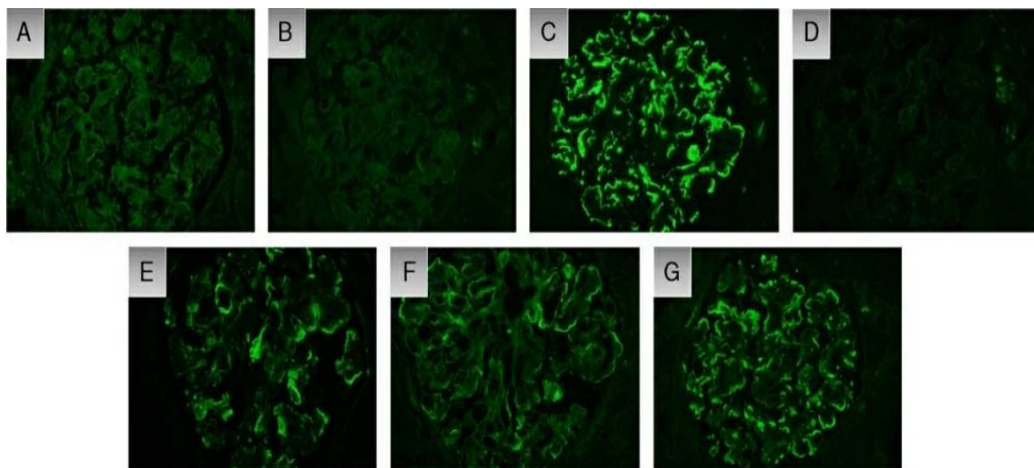


Figure 26: l'étude en IF des sous-classes d' IgG est nécessaire pour le diagnostic de la glomérulonéphrite à dépôts d'immunoglobulines monotypiques: IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C), IgG4 (D). La monoclonalité des dépôts d'Ig G ne peut pas toujours être déterminée par l'étude des chaînes kappa et lambda si des dépôts d'immunoglobulines non IgG concomitantes (tels que les IgM, qui sont souvent non spécifiques) sont présents. E-G, même cas que A-D : IgM (E), kappa (F), lambda (G)[33].

3. Marqueurs mis en évidence par immunohistochimie/ technique à l'immunopéroxydase :

* DNAJB9 : [35]

La glomérulonéphrite fibrillaire (GNF) est une maladie rare. Les critères actuels de diagnostic de cette maladie exigent la mise en évidence de fibrilles droites, disposées au hasard et mesurant de 10 à 30 nm d'épaisseur dans le mésangium et/ou le long des membranes basales glomérulaires visualisées par microscopie électronique (EM). En immunofluorescence (IF), dans la plupart des cas, les dépôts fixent les Ig G, les chaînes légères k et L, et le C3.

En microscope électronique, il est difficile de distinguer la GNF des autres pathologies qui présentent des fibrilles ou microtubules, notamment l'amylose, la glomérulopathie immunotactéoïde associée à la leucémie lymphocytaire chronique, la fibrillose diabétique et la glomérulopathie à fibronectine.

Grâce à l'utilisation de la microdissection laser, la chromatographie liquide assistée par spectrométrie de masse en tandem (LMD/MS-MS), Samih N et al [35] ont récemment découvert un nouveau biomarqueur protéomique pour la GNF : l'homologue B de l'ADNJ, membre 9 (DNAJB9), un membre de la famille des gènes co-chaperons moléculaires.

Ils ont découvert que même dans les cas précoces et subtils de GNF qui ne peuvent pas être suspectés par la MO, La recherche de DNAJB9 en IHC était positive dans certaines zones mésangiales. Le DNAJB9 mis en évidence par IHC permet également de confirmer le diagnostic de GNF dans les cas de maladie glomérulaire concomitante (qui était présente dans 17% des cas étudiés) [35].

Il est important de noter, que le DNAJB9 n'a pas été détecté dans les cas d'amylose, de la néphropathie diabétique avec fibrillose, ou de glomérulopathie à fibronectine, ce qui indique que le DNAJB9 en IHC peut distinguer la GNF des autres maladies rénales qui sont caractérisées par des dépôts fibrillaires glomérulaires [35].

Les membres de la famille des protéines DNAJ agissent comme un co-chaperons pour les protéines de choc thermique (Hsp70), qui sont des chaperons moléculaires importants pour le pliage, le déploiement, la translocation ou la dégradation des protéines. Au total, 41

protéines DNAJ/Hsp70s ont été identifiées dans le génome humain. Le DNAJB9, également connue sous le nom de Mdg-1 ou ERdj4, est un membre de cette famille découvert en 2002 . Il est localisé dans le réticulum endoplasmique (RE), où il interagit avec la BiP dans la lumière du RE et stimule son activité ATPase. Il est régulé à la hausse en réponse au stress du RE, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans le repliement des protéines ou la dégradation des protéines associées au RE [35].

Samih N et al ont trouvé une coloration cytoplasmique variable (généralement faible) et finement granulaire des cellules épithéliales tubulaires, des cellules glomérulaires, des cellules musculaires lisses vasculaires et de rares cellules inflammatoires interstitielles dans beaucoup de cas. Cette coloration granulaire de "fond" ne doit pas être confondue avec la coloration extracellulaire homogène et beaucoup plus intense des dépôts glomérulaires dans la FGN. Les moulages tubulaires et les faisceaux nerveux (lorsqu'ils sont échantillonnés) ont également montré une positivité granulaire non spécifique pour le DNAJB9

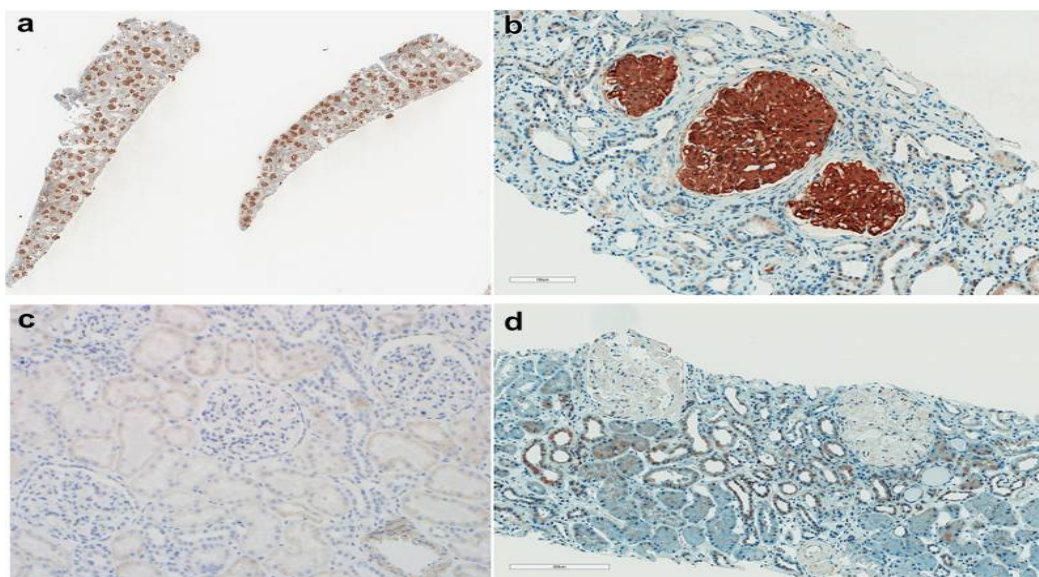


Figure 27: Immunohistochimie DNAJB9 au cours de la de glomérulonéphrite fibrillaire (FGN) . (a, b) L'immunohistochimie montre une forte coloration glomérulaire pour le DNAJB9 dans 2 cas différents de GN fibrillaire. (c) Les glomérules normaux et l' amylose à chaîne légère κ ne présentent pas de fixation avec le DNAJB9. (a, Grossissement d'origine $\times 20$; b – d, grossissement d'origine $\times 200$.) [35].

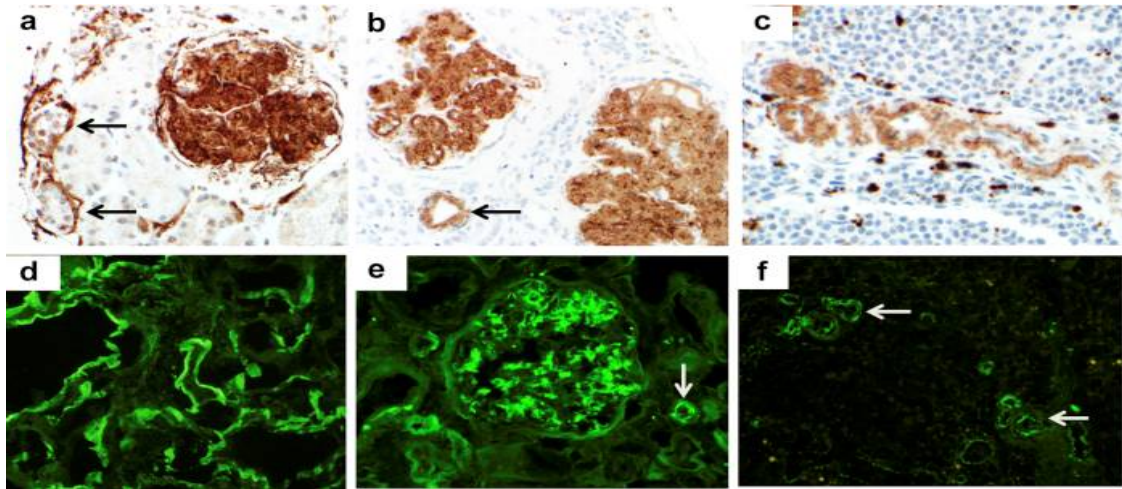


Figure 28: Dépôts extraglomérulaires de DNAJB9 dans la glomérulonéphrite fibrillaire (GNF). (a) Marquage focale des membranes basales tubulaires (flèches) au marquage glomérulaire. (b) Dépôts dans la paroi d'une artériole (flèche). (c) Dépôts dans la paroi des artérioles spléniques. (d) Immunofluorescence : dépôts linéaires des membranes basales tubulaires avec l'Ig G. (e) Immunofluorescence : dépôts dans une artériole (flèche) avec l'IgG. (f) Les artérioles spléniques du même cas qu'en (c) présentent des dépôts d'IgG en immunofluorescence (flèches). (a – e, Grossissement original $\times 400$; f, grossissement original $\times 200$ [35]).

*** CD44 :**

Le cluster de différenciation 44 (CD44) est une glycoprotéine transmembranaire, récepteur de l'acide hyaluronique, qui joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la liaison au stroma, la migration et les interactions cellule-cellule.

C'est un marqueur des cellules épithéliales pariétales activées qui sont à l'origine des croissants cellulaires et des pseudocroissants de la hyalinose segmentaire et focale de type collapsing [36].

*** CD80 (B7-1) :**

Le CD80 (également connu sous le nom B7-1) est une glycoprotéine membranaire qui se trouve sur les cellules présentant l'Ag(CPA) ou les cellules naturelles killer, elle fonctionne comme un ligand, joue un rôle important dans l'activation et l'inactivation des cellules T en se liant au CD 28 ou au cytotoxique T-lymphocyte-associated-4 (CTLA-4).

Récemment découverte dans les podocytes des souris déficientes pour l'intégrine $\alpha 3$ (l'intégrine $\alpha 3$ est un récepteur d'adhésion important dans les podocytes) et présentant un syndrome néphrotique.

Une étude faite en 2013 par Yu et al. sur un échantillon de cinq patient atteints d'un syndrome néphrotique, a montré une immunoloration positifs de tous les biopsies, et une rémission partielles ou totale de la protéinurie après un traitement par abatacept. Cependant, un examen plus approfondi du rapport de Yu et al a révélé plusieurs problèmes à savoir le nombre réduits des échantillons examinés (5patients), l'absence de témoin négatifs et le manque de contrôle de traitement [37].

En 2014 une autre étude a été faite sur 60 échantillons de biopsie des patients atteints d'un syndrome néphrotique, en utilisant 2 anticorps différents, par P. Larsen, C. Messias, et D. Walker, et qui n'a identifiés aucun cas avec une coloration positive des podocytes B7-1[37].

Nous concluons que l'immunoloration B7-1 est peu susceptible de servir de colorant diagnostique utile soutenant l'utilisation du traitement abatacept.

*** Ki-67 :**

Le Ki-67 est une protéine à demi-vie courte (1h), présente dans toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) et elle est absente dans les cellules au repos.

Le Ki-67 peut être utilisé comme marqueur de prolifération dans les échantillons de biopsie rénale pour les patients diagnostiqués avec un lupus érythémateux disséminés [38].

*** Claudin :**

Les Claudins sont les principaux constituants des complexes à jonctions serrées, qui régulent la perméabilité des épithéliums. Plus de 20 isoformes ont été identifiés à ce jour ; l'expression de chacune semble être spécifique au tissu.

L'origine des cellules responsable des lésions en forme de croissant dans la glomérulonéphrite humaine (GN) reste inconnue. Certaines études faites sur des animaux ont démontré que les cellules épithéliales pariétales de la capsule de Bowman (PEC) étaient le principal composant des cellules en prolifération et que la claudine-1 (protéine de jonction

serrée spécifique des PEC) était exprimée dans les lésions en croissant. Ryo et al ont étudié l'expression de la claudine-1 dans la GN humaine. L'immunohistochimie de la claudine-1 a été réalisée sur 17 échantillons de biopsie rénale avec formation de croissants. La co-localisation de la claudine-1 avec la protéine de jonction intracellulaire serrée ZO-1 a également été évaluée par double coloration en immunofluorescence. La claudine-1 est principalement exprimée au niveau du site de contact de cellule à cellule des cellules en prolifération dans les lésions en croissant cellulaire chez les patients atteints de ces formes de GN humaine. Un petit nombre de cellules formant des croissants a montré une localisation extra-jonctionnelle de la claudine-1. La co-localisation de la claudine-1 avec la ZO-1 a été trouvée au niveau des sites de contact entre cellules de cellules proliférantes adjacentes. Dans les échantillons témoins, la coloration de la claudine-1 était positive dans les PEC, mais pas dans les podocytes. Leurs résultats suggèrent que la claudine-1 contribue à la formation de croissants en tant que composant du complexe protéique de jonction serrée qui inclut ZO-1. La co-localisation de la claudine-1 avec ZO-1 implique la formation de complexes fonctionnels de jonction serrée dans les lésions en croissant pour prévenir les dommages interstitiels causés par la pénétration de molécules filtrées de l'espace de Bowman [39].

✦ **Pax-2 :**

Le PAX2, est un facteur de transcription nucléaire dans le développement rénal, est fortement exprimé pendant le développement des reins. IL joue un rôle important dans le développement, la différenciation et la prolifération des cellules rénales. Le PAX2 est exprimé dans les cellules épithéliales des reins du fœtus et son expression est régulée à la hausse dans certaines conditions pathologiques. Cependant, l'activation de la transcription de PAX2 et ses voies de signalisation est compliquées. Des découvertes récentes montrent que le gène PAX2 est essentiel au développement des reins et qu'il est impliqué dans la pathogenèse de la fibrose interstitielle rénale (FIR) et de la glomérulosclérose (GS) [40].

✦ **Wt1 (Wilms' tumor suppressor gene):**

Le WT1, est un gène codant une protéine de doigt de zinc qui régule le développement des podocytes et il est fortement exprimé dans les podocytes matures. Les mutations du gène WT1 sont associées au développement d'une insuffisance rénale due à la formation de tissu cicatriciel à l'intérieur des glomérules.

Chez des patients atteints du syndrome de Denys-Drash, des mutations dans les régions impliquées dans la fixation de l'ADN ou la formation de doigts de zinc ont été détectées, c'est un trouble associé à la sclérose mésangienne diffuse infantile, à la dysgénésie gonadique et à la tumeur de Wilms^{12, 13, 14}. Des mutations perturbant un site donneur d'épissage alternatif dans l'intron 9, entraînent le syndrome de Frasier, qui est un trouble associé à la glomérulosclérose segmentaire focale (FSGS), à une prédisposition au gonadoblastome et à un pseudohermaphrodisme masculin. En outre, des mutations du Wt1 ont été signalées dans un syndrome néphrotique primaire isolé résistant aux stéroïdes, ce qui confirme le rôle de la fonction aberrante du Wt1 dans la pathogenèse de la glomérulosclérose [41].

*** C3b :**

Le C3b est une glycoprotéine membranaire, qui représente le principal récepteur des érythrocytes, leucocytes, lymphocytes, et les monocytes. Le C3b joue un rôle important dans le traitement des complexes immuns, la phagocytose des micro-organismes porteurs de C3b et la régulation de la réponse immunitaire.

L'absence d'immunofluorescence au niveau des échantillons de biopsies rénales traités par des Ac anti-C3b, indique la suppression de cette protéine membranaire du podocyte, observées au cours des pathologies qui entraîne une altération de la biosynthèse et du renouvellement du récepteur des podocytes, telle que la hyalinose segmentaire focale (HSF) et le LED au stade de néphropathie sévère [42].

*** PLA2R1 :**

C'est une enzyme lytique membranaire, qui réside dans la membrane plasmique des podocytes. Son rôle physiologique reste inconnu.

L'anticorps anti_ PLA2R1 est un biomarqueur pour le diagnostic de la glomérulonéphrite extra-membraneuse primaire. Il permet également la surveillance de son activité et de prédire les rechutes [43].

× CD10 :

Une étude a été faite par G.Faa et C Genosa, concernant deux fœtus et trois nouveaux nés, sur l'immunoréactivité du CD10 au cours du développement embryonnaire, a montré le rôle de CD10 dans l'embryogénèse rénale. Chez les deux fœtus, l'immunoréactivité CD10 était concentré sur le cortex mi-profond (l'épithélium glomérulaire, le tubule proximal, et les cellules mésenchymateuse métanéphriques). A 25 semaine gestationnel le CD10 a été détectée également dans la région sous capsulaire y compris certains agrégat pré-tubulaire des cellules mésenchymateuse de la calotte et des vésicules rénales. A 34 semaines gestationnel, l'immunoréactivité CD10 a été observée dans la glomérule viscérale et pariétale. A 39 semaines le CD10 a été observée dans les tubules collecteurs et les anses d'Henlé [44].

Chez le rein adulte, l'immunoréactivité CD10 a été positive dans toute la région corticale y compris les zones sous capsulaires, la glomérule, et les tubules proximales. Le CD10 a colorée sélectivement les podocytes, les cellules de la capsule de Bowman, et la région apicale du tubule proximale. Au niveau de la médullaire la réactivité de CD10 était focale, principalement localisés dans les tubules collecteurs [44].

Sur la base de ces observations l'équipe de G. Faa et C. Genosa ont conclu trois rôles possibles du CD10 :

- Il Participe à la différenciation des cellules glomérulaires et tubulaires.
- Il Permet l'inactivation des peptides détectée dans le liquide urinaire.
- Il Permet la régulation et le maintien des cellules souches rénales [44].

Des études supplémentaires sont nécessaires sur l'immunoréactivité des CD10 dans les reins dysplasiques, afin de mieux caractériser leur rôle au cours de la néphrogénèse.

L'étude de la néphrogénèse par l'IHC pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la médecine régénérative rénale, mettant en évidence les facteurs capables de prolonger la néphrogénèse après la naissance et donc permettre au rein du nouveau né de restaurer leur dotation en néphron, échappant ainsi à la vulnérabilité, à l'hypertension et aux maladies rénales à l'âge adulte [45].

*** CD20 :**

C'est une protéine présente à la surface des lymphocytes B joue un rôle dans la maturation, le développement et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes.

L'infiltration de cellules B CD20 positive dans les biopsies d'allogreffes rénales avec un rejet cellulaire aigu(ACR) est associé a un rejet moins résistant aux stéroïdes et à une meilleur survie du greffon. la présence de cellules B positives pour CD20 protège les allogreffes rénales [46].

*** CXCL9 :**

La Ligand de chimiokine 9 ou monokine induit par l'interféran gamma(MIG) est une cytokine qui appartient à la famille des chimiokines CXC.

C'est un puissant chimioréactif des cellules T produit par les macrophages

Les Ac anti CXCL9 permet la mise en évidence des macrophages dans les GNMP, et les cellules géantes dans les croissants de la glomérulonéphrite avec anticorps anti membrane basale glomérulaire [47].

*** Kappa et Lambda :**

Les protéines de Berces Jones ou chaîne légères libres (CLL) sont synthétisées par les plasmocytes de la moelle osseuse et les ganglions.

En situation physiologique, les CLL sériques polyclonales sont filtrées au niveau glomérulaire et réabsorbées par le tubule proximal et 1 à 10 mg/j sont secrétés par les muqueuses du TD

L'étude de la fixation des AC anti chaîne légères d'immunoglobulines IF, permet le diagnostic de l'amylose AL [48].

*** SAP :** le composant P des dépôts amyloïdes (glycoprotéine sérum amyloïde)

C'est une protéoglycane liée aux protéines amyloïdes, il permet de protéger les fibrilles amyloïdes du catabolisme tissulaire.

Le composant P des dépôts amyloïdes est présent dans tous les dépôts quelle que soit la protéine en cause

Il est utilisé in vivo pour détecter les dépôts amyloïdes [49].

✦ **SAA** : sérum amyloïde associated

C'est une apolipoprotéine associée aux lipides de haute densité (HDL), il appartient à la famille des protéines de l'inflammation, phase pendant laquelle sa concentration sérique est multipliée par 100 à 1000, sous l'influence essentiellement d'IL-6, IL-1 et le TNF.

L'étude en IP des Ac anti-SAA permet le diagnostic de l'amylose AA [49].

✦ **ApoA1_ ApoA2** :

Ce sont des protéines amyloïdogènes, synthétisées au niveau hépatique et intestinal, et catabolisées au niveau hépatique et rénal

Ils représentent le constituant majeur de lipoprotéine de haute densité (HDL)

La recherche des AC anti APOA permet le diagnostic des amylose à APOA [50].

✦ **LECT2** :

C'est un facteur de croissance produit par le foie.

La recherche des Ac anti LECT2 permet le diagnostic des Amylose à LECT2 [51].

✦ **TTR** :

La TTR est une protéine de transport, synthétisée principalement au niveau du foie, et a une faible quantité par l'épithélium pigmentaire de la rétine et le plexus choroïde.

La TTR a la capacité intrinsèque de former des agrégats de fibrilles amyloïdes insoluble, qui peuvent induire une toxicité ainsi que des dommages tissulaires

La recherche des Ac anti-TTR permet le diagnostic des amylose à TTR [52].

✦ **Type III du collagène** :

C'est une protéine structurelle de la matrice extracellulaire n'est présente que dans l'interstitium et les vaisseaux sanguins et non dans les glomérules.

L'accumulation de fibrille de collagène de type III dans la matrice mésangiale et l'espace sous-endothéliale est une caractéristique de la glomérulopathie au collagène III [53].

× **Fibronectin :**

C'est une protéine impliquée dans certains processus cellulaires notamment l'adhésion cellulaire, la migration et la différenciation cellulaire.

L'immunomarquage de la fibronectin permet le diagnostic de la glomérulopathie à fibronectine [54].

× **Hbc Ag :**

C'est une protéine virale de l'hépatite B.

Mis en évidence dans des complexes immuns déposés en sous épithélial (extra-membraneux) dans les atteintes glomérulaires secondaire à une infection par le virus B de l'hépatite [55].

× **Apo lipoprotéine Bou E :**

C'est une protéine synthétisée par le foie impliqués dans le transport des lipides dans le sang.

Elle est mise en évidence dans la glomérulopathie à lipoprotéine [56].

4. Microscopie électronique : [57,58]

L'étude de l'échantillon rénal par le ME permet une analyse fine des structures et des dépôts non observés par le microscope optique et l'IF.

Le microscope électronique est utile en cas :

- D'IHC négative, ou difficile à interpréter en particulier quand le pathologiste a utilisé des coupes incluses en paraffine et non les coupes congelées [58].
- La présence d'une d'hématurie (maladie des membranes basales fines ou syndrome d'Alport),
- pour examiner les agrégats atypiques au cours de la glomérulopathie fibrillaire,
- Il permet de confirmer la présence de complexes immuns, surtout s'ils sont minimes [57].

4 –a Les aspects spécifiques en ME :

La ME permet de confirmer les résultats obtenus par les autres techniques (MO et l'IF), car elle est essentielle pour le diagnostic de certaines maladies comme :

*** Le syndrome néphrotique à « lésions glomérulaires minimales » :**

En microscope électronique, les cellules épithéliales viscérales montrent l'effacement des pédicelles (fig42), avec des glomérules histologiquement normaux.

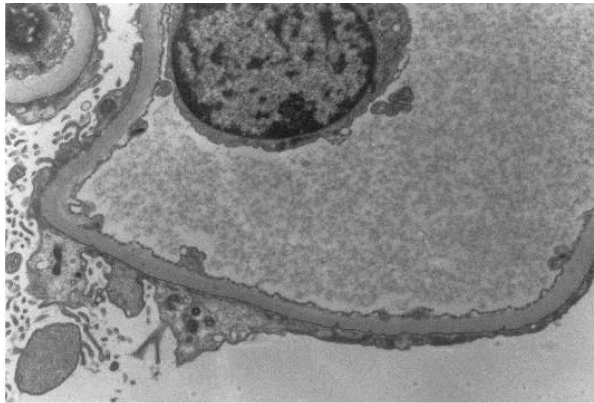


Figure 29: Microscopie électronique. L'effacement des pédicelles des podocytes de (l'épithélium viscéral) d'une boucle capillaire glomérulaire au cours d'une maladie glomérulaire minime.x7000.[58]

*** Les néphropathies héréditaires :**

En microscope électronique les néphropathies héréditaires montrent une lamellation spécifique de la membrane basale glomérulaire, et/ou une membrane basale fine glomérulaire. Ces deux caractéristiques peuvent se produire séparément mais souvent l'amincissement précède la lamellation. (Fig.43)

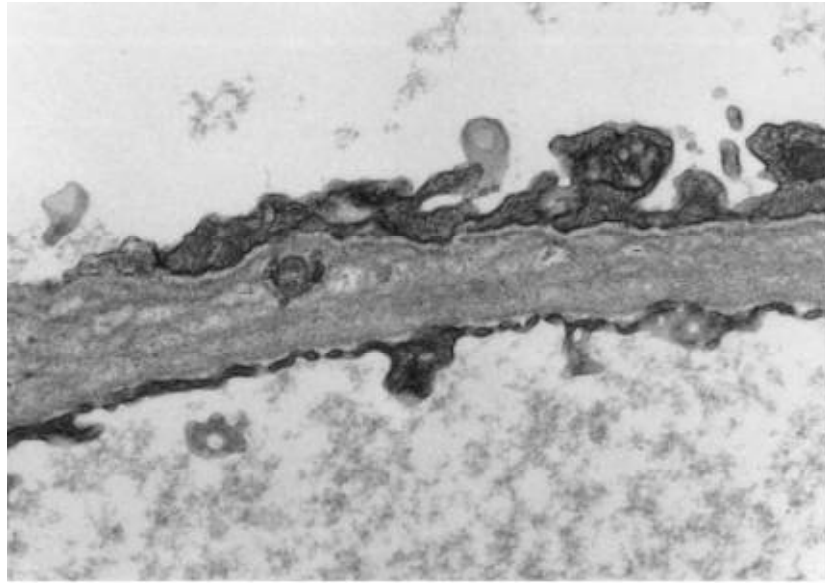


Figure 30: Microscopie électronique. Le syndrome d'Alport. Une lamellation de la membrane basale glomérulaire est caractéristique .x 19 000.[58]

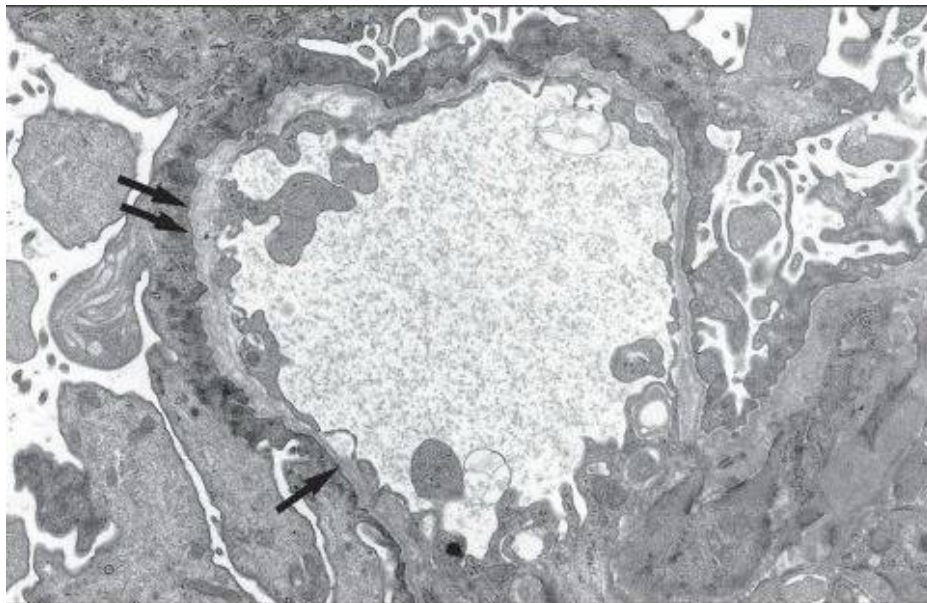


Figure 31: Microscopie électronique. La membrane basale glomérulaire vue par microscope électronique, d'un garçon de 10 ans atteint du syndrome d'Alport lié à l'X. Montre une alternance d'épaisseur de MBG, épaisse et fendue (doubles flèches) et minces (flèche simple). (Acétate d'uranyle-citrate de plomb, × 13 200.) [59]

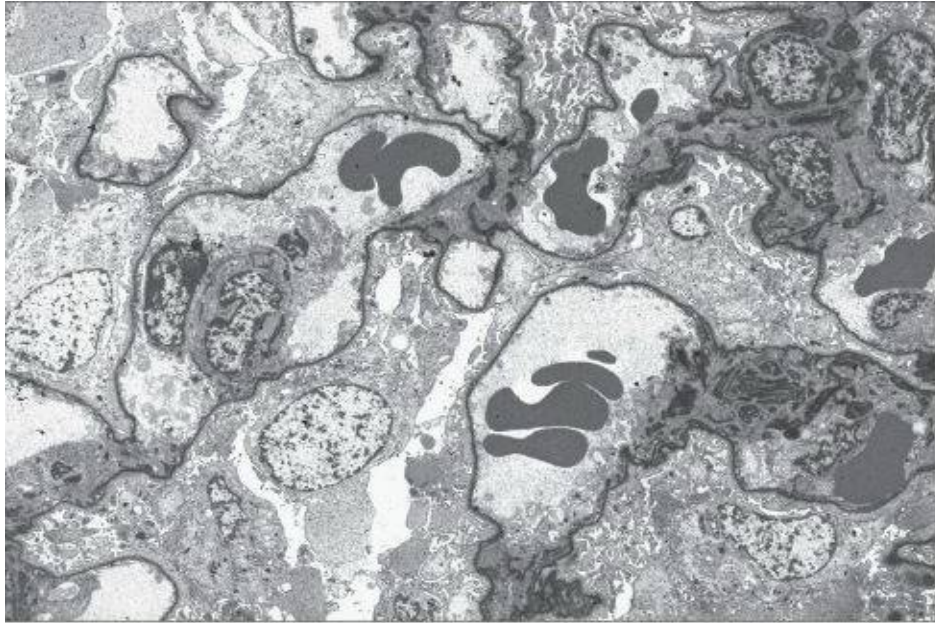


Figure 32: Microscopie électronique. Un patient de sexe masculin âgé de 26 ans atteint du syndrome d'Alport lié à l'X qui a développé une IRT à l'âge de 37 ans. **Notez l'atténuation généralisée de la MBG. (Coloration à l'argent méthénamine × 2500.) [59]**

✦ **Glomérulonéphrite membranoproliférative type II (maladie des dépôts denses)**

L'étude en ME permet de différencier les glomérulonéphrites type I et II.

La GNMP type II se montre avec un dépôt linéaire dans la membrane basale glomérulaire.

✦ **Glomérulopathies fibrillaires :**

Les glomérulopathies fibrillaires sont détectées uniquement par microscope électronique, en cas de rouge Congo négatif et la présence de dépôts d'Ig G et C3 en IF.

Les dépôts sont observés dans le mésangium sous forme de brins fibrillaires disposés de façon aléatoire.

✦ **Glomérulopathie immunotactôïde :**

En microscope électronique les dépôts observés dans la membrane basale glomérulaire forment des brins microtubulaires parallèles de 17- 90 nm de diamètre (Fig46)

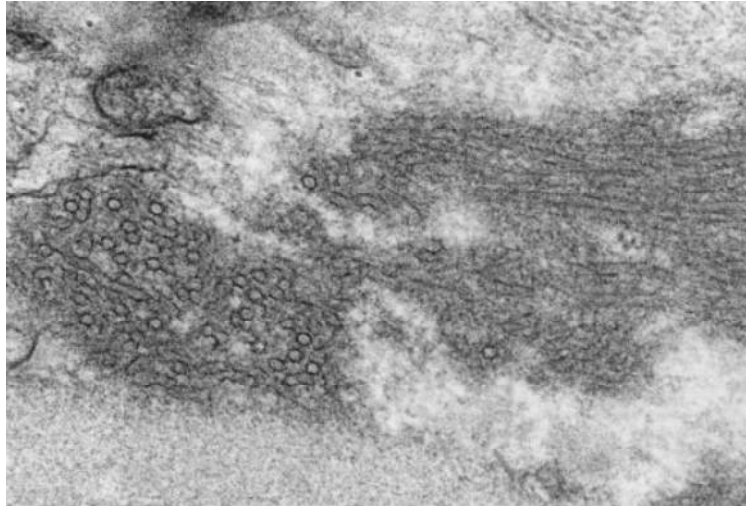


Figure 33: Microscope électronique, Glomérulopathie immunotactôïde. Agrégat de fibrilles microtubulaires dans la membrane basale glomérulaire x 59 000. [58]

4 -b. Pathologies diagnostiquées par d'autres techniques et confirmées par la ME :

*** Glomérulosclérose segmentaire et focale :**

Le microscope électronique permet de différencier la forme primaire idiopathique et la forme secondaire. La première présente un effacement complet des pédicelles des podocytes alors que la forme secondaire présente un effacement segmentaire.

*** Néphropathie à IgA :**

L'utilisation de la microscopie électronique pour le diagnostic de la néphropathie à Ig A est complémentaire. Il confirme le diagnostic en révélant les dépôts denses aux électrons dans les régions mésangiales et para-mésangiales.

*** Glomérulonéphrite extra-membranaire :**

La glomérulonéphrite extra- membranaire peut être diagnostiquée par l'étude en MO, bien que le microscope électronique offre des informations supplémentaires

L'étude en ME est utile au début de la maladie, lorsque quelques petits dépôts dispersés sont présents, avec une IF ou une IHC difficiles à interpréter surtout pour les sections traitées en paraffine.

✖ **Lupus érythémateux disséminés :**

Le lupus érythémateux est caractérisé par la présence des dépôts de complexe immuns.

Le microscope électronique permet de confirmer la localisation exacte de ces dépôts (sous- endothéliale, sous épithéliale, et mésangial) (fig 47).

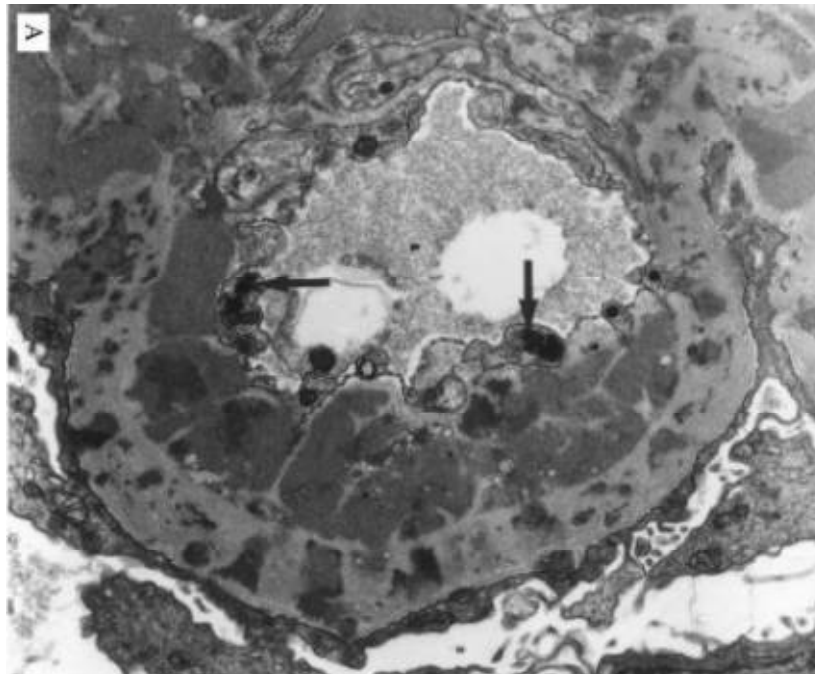


Figure 34: Microscopie électronique Lupus érythémateux disséminé. (A) L'épaississement de la membrane basale glomérulaire d'un boucle capillaire avec des dépôts sous-endothéliaux denses en électrons. Les cellules endothéliales présentent des inclusions tubulo-réticulaires (flèches).x7100 [58]

× **Glomérulonéphrite post-infectieuse :**

En microscope électronique, la glomérulonéphrite post infectieuse est caractérisée par la présence des dépôts denses de complexes immuns « humps » épithélial au niveau de la membrane basale glomérulaire.

On observe aussi des dépôts sous endothéliaux et mésangiaux, un gonflement de l'endothélium et des neutrophiles intraluminaux (fig 48).

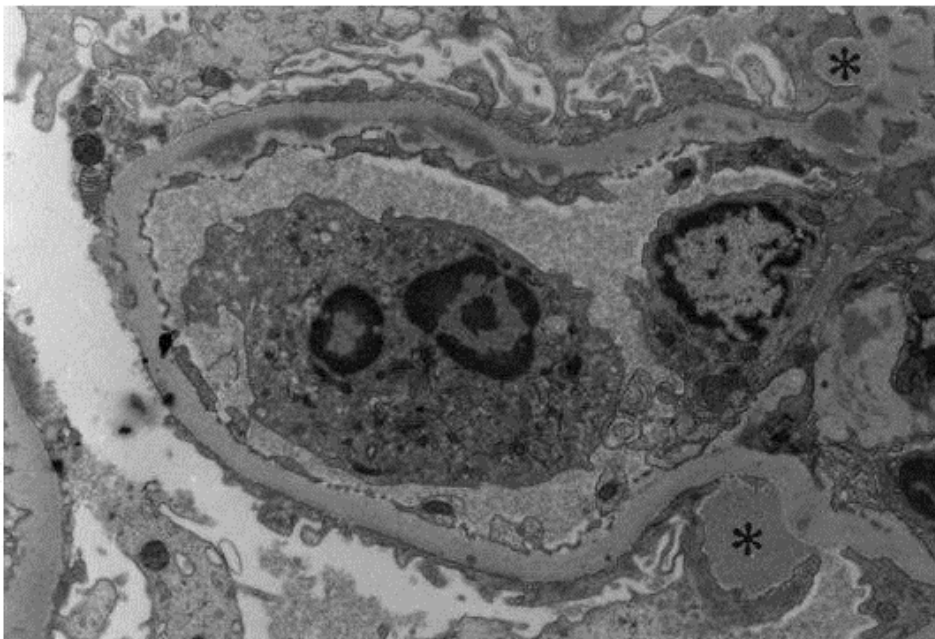


Figure 35: ME. La glomérulonéphrite post-infectieuse,. Une boucle capillaire glomérulaire qui présente des dépôts denses aux électrons "humps" (*) à la jonction entre le mésangium et la membrane basale glomérulaire. x7300[58].

✖ **Diabète sucré :**

L'épaississement de la MBG au cours du diabète peut être observé en microscopie électronique avant les signes cliniques de la maladie rénale. (Fig 49)

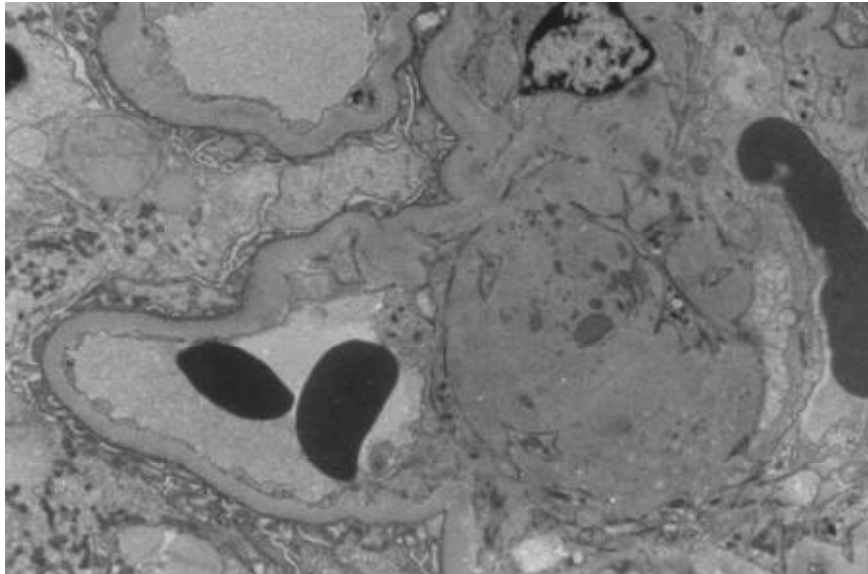


Figure 36: ME. Epaississement de la membrane basale glomérulaire, au cours d'un diabète sucré [58].

✖ **L'amylose :**

La présence des dépôts amyloïdes est identifiée par une coloration rouge Congo positive en lumière polarisée, et une thioflavine-T positive (en IF).

Le microscope électronique est utile en cas de dépôts amyloïdes peu abondants. Il permet d'identifier des brins de 8-12nm de diamètre, disposés de manière aléatoire et non ramifiés (fig50) [58].

L'utilisation de la coloration « immunogold » permet de différencier les chaînes Kappa et lambda.

Il est important de noter que l'ultrastructure de l'amyloïde reste intacte lors de la réutilisation des échantillons provenant d'un bloc congelé ou inclus en paraffine.

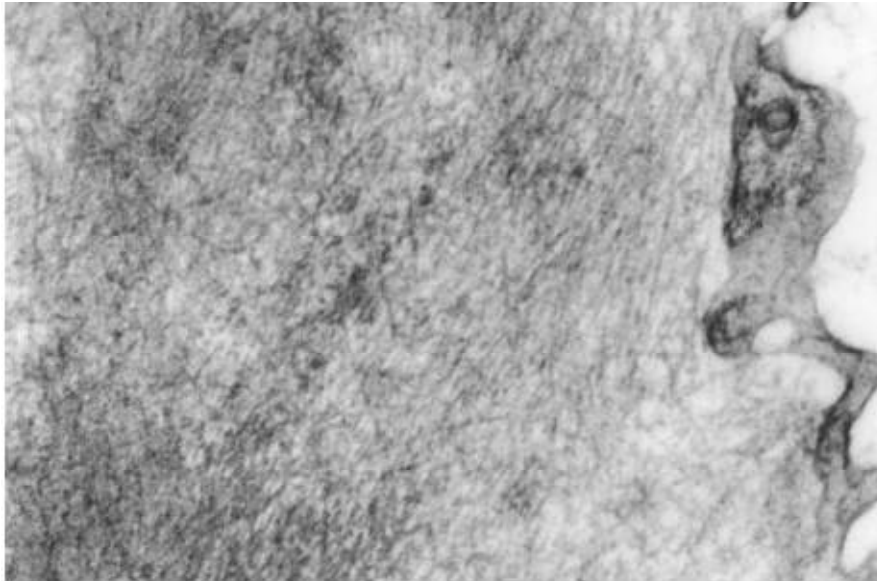


Figure 37: Microscope électronique, Amylose. Des brins d'amyloïde disposés au hasard et non ramifiés dans la membrane basale glomérulaire.x 69 000 [58].

*** Altérations mésangiocapillaires :**

Des changements mésangiocapillaires sont observés au cours de la glomérulonéphrite membranoproliférative type I. Ils sont dus à la mise en place d'une deuxième couche de membrane basale après interposition de cellules mésangiales ou d'un dépôt de complexes immuns entre la cellule endothéliale et la membrane basale glomérulaire pré-existante (Fig.51).

Le **dédoublément** de la MBG peut être observé dans d'autres maladies comme la néphropathie à VIH. Certains cas de LES et d'hépatite C.

Le microscope électronique offre des informations précieuses pour le diagnostic différentiel de ces différentes pathologies.

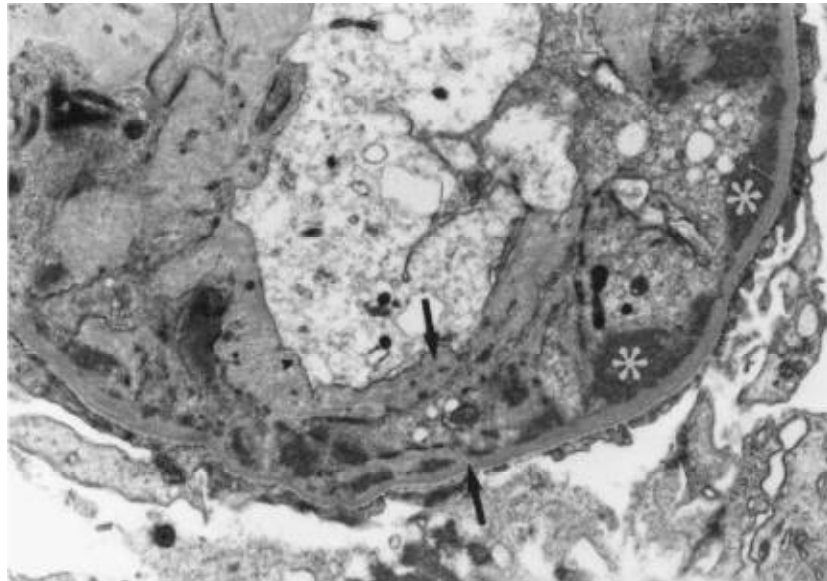


Figure 38: Microscope électronique, Altérations mésangiocapillaires dans une boucle capillaire glomérulaire d'un patient atteint d'hépatite C. Deux couches de membrane basale glomérulaire sont présentes (flèches) avec interposition de cytoplasme entre elles. Les dépôts denses en électrons (*) x7500[57].

× Biopsie de transplantation rénale :

Pour les biopsies de transplantation rénale, l'étude en microscopie électronique permet de différencier les glomérulonéphrites de novo et récurrentes, si les résultats de l'IF ne sont pas concluants.

5- Techniques non morphologiques :

Exemple du typage de l'amylose par protéomique :

L'identification de la protéine amyloïde est primordiale car elle conditionne le traitement qui doit être spécifique pour chaque type d'amylose.

Actuellement le typage de l'amylose repose sur une technique conventionnelle d'immunomarquage (IF, IHC), mais cette technique présente de nombreuses limites et difficultés (détaillés sur le tableau VI)

Cependant, il existe d'autres techniques moléculaires, qui permettent l'identification par spectrométrie de masse de la protéine amyloïde, après microdissection laser des dépôts à partir d'un bloc de tissu fixé et inclus en paraffine [60].

Cette technique permet de préciser la nature de la protéine amyloïde en cause dans 97% des cas, elle permet également de confirmer le diagnostic de l'amylose en mettant en évidence des protéines constamment associées aux protéines amyloïdes (ApoE, composant P)[60].

Tableau VI : avantages et inconvénients des deux technique protéomique et immunomarquage utilisé pour le typage de l'amylose

	Avantages	Inconvénients
Protéomique	<ul style="list-style-type: none"> • Peut être utilisée sur tous les tissus • Ne nécessite pas de fragment congelé • Explore sans à priori l'ensemble des protéines candidates : permettant donc l'identification de nouvelles protéines amyloïdes 	Technique complexe, longue et onéreuse
Immunomarquage	Plus Rapide	<ul style="list-style-type: none"> • Nécessite des fragments congelés • Panel d'Ac insuffisant car ne couvrant pas l'ensemble des protéines candidates. • La présence de fausse positivité • La présence de Fausse négativité • Pathologiste expérimenté • Certains Ac ne réagissent pas avec des protéines mutées.

a- Technique :

Les étapes de la technique sont les suivantes :

- Extraction des protéines à partir d'un bloc de tissu fixé et inclus en paraffine (FFPE) : La protéine responsable de l'amylose doit être isolée des protéines des tissus normaux pour permettre son identification.
- Microdissection laser pour enrichir l'échantillon à analyser en protéine amyloïde,
- Extraction des protéines et fragmentation par la trypsine,
- Séparation des peptides par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC),
- Détermination de courtes séquences peptidiques par spectrométrie de masse en tandem,
- L'identification protéique avec des bases de données puis l'interprétation [60].

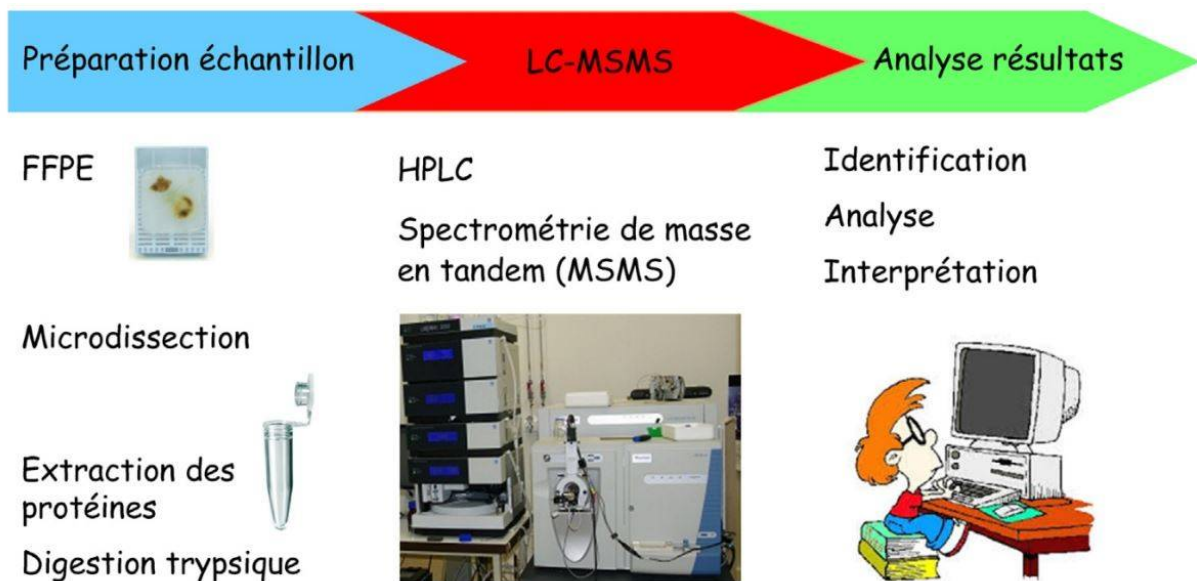


Figure 39: les étapes de typage des amyloses par protéomique[60].

b- Indication du typage d'amylose par protéomique :[60]

- Rouge Congo douteux
- Immunomarquage non contributif
- Discordance entre les données cliniques, biologiques, génétiques et le résultat du typage par immunomarquage.
- Doute sur une protéine amyloïde non encore caractérisée.



CONCLUSION

La ponction biopsie rénale est une étape incontournable dans l'étude des maladies rénales. Elle fournit des arguments histologiques indispensables qui créent les bases de la nosologie des néphropathies, en particulier glomérulaires.

Les techniques utilisées dans les laboratoires de pathologie ont progressé et se sont diversifiées au cours des dernières décennies. En plus des techniques classiques (microscopie optique, immunofluorescence, microscope électronique), de nouvelles techniques ont été développées dans un but diagnostique et de recherche. Ce sont des techniques non morphologiques à savoir la spectrométrie vibrationnelle, la spectrométrie de masse et la biologie moléculaire.

Il est primordial pour le clinicien de bien connaître l'ensemble des techniques réalisables à partir des carottes biopsiques et les modalités de prise en charge adaptées à chaque type de technique. Une bonne collaboration entre le néphrologue et le pathologiste est indispensable pour un rendement optimal de ce geste invasif.



RESUMES

Résumé

Titre : La PONCTION BIOPSIE RENALE : Techniques anatomopathologiques (Histologie conventionnelle et techniques spéciales)

Auteur : ZIOUANI Mariam

Rapporteur : Pr. ROUAS Lamiaa

Mots-clés : Biopsie rénale, Immunofluorescence, Microscopie optique, Microscopie électronique, protéomique.

La biopsie rénale est un outil diagnostique indispensable aux cliniciens. Ses principales indications sont représentées par le syndrome néphrotique et l'insuffisance rénale rapidement progressive etc.. Elle peut être réalisée par voie percutanée, par voie trans veineuse ou par voie chirurgicale. Le matériel prélevé doit être suffisant (2 à 3 cylindres) pour un examen optimal. Les carottes biopsiées sont ensuite envoyées au laboratoire pour division et étude anatomopathologique.

Les fragments destinés à l'étude en microscope optique sont fixés, déshydratés, inclus en paraffine, coupés et colorés par des colorations systématiques (HE, Trichrome de Masson, PAS, et coloration argentique). Des colorations spéciales sont utilisées en fonction de la pathologie recherchée. Les coupes destinées à l'étude en IHC sont traitées par des anticorps conjugués à la fluorochrome : les immunoglobulines (principalement IgG, IgM et IgA), les composants du complément (principalement C3, C1q et C4), la fibrine et les chaînes légères kappa et lambda. Des anticorps supplémentaires peuvent être nécessaires dans des circonstances spécifiques. Les coupes destinées à l'étude en ME sont colorées par le bleu de toluidine. Après prélèvement et colorations, l'examen anatomopathologique apporte des informations diagnostiques utiles.

En plus de ces techniques classiques, de nouvelles techniques ont été développées dans un but diagnostique et de recherche. Ce sont des techniques non morphologiques à savoir la polymérase Chain réaction (PCR) virales (cytomégalovirus, BK virus par exemple) mettant en évidence l'acide ribonucléique (ARN) ribosomique des bactéries à partir du prélèvement frais ou congelé. La spectrométrie vibrationnelle pour l'étude des cristaux. La spectrométrie de masse après microdissection de zones d'intérêt, pour caractériser le spectre des dépôts amyloïdes et déterminer le type de la protéine amyloïde précurseur. Le microarrays pour le diagnostic du rejet humoral et cellulaire.

Il est primordial pour le clinicien de bien connaître l'ensemble de ces techniques réalisables à partir des carottes biopsiques rénales et les modalités de prise en charge adaptées à chaque type de technique.

L'objectif de notre travail est de détailler les différentes modalités techniques (conventionnelles et techniques spéciales) utilisées pour l'étude anatomopathologique de la biopsie rénale.

Abstract

Title: RENAL BIOPSY : Anatomopathological techniques (conventional histology and special techniques)

Author: ZIOUANI Mariam

Reporter : Pr. ROUAS Lamiaa

Keywords: Renal biopsy, Immunofluorescence, Optical microscopy, Electron microscopy, , proteomics.

Kidney biopsy is an indispensable diagnostic tool for clinicians. Its main indications are represented by nephrotic syndrome and rapidly progressive renal failure etc..... It can be performed percutaneously, by trans venous route or surgically. The material collected must be sufficient (2 to 3 cylinders) for an optimal examination. The biopsied cores are then sent to the laboratory for division and anatomopathological study.

The fragments intended for study under an optical microscope are fixed, dehydrated, included in kerosene, cut and stained by systematic staining (HE, Trichrome de Masson, PAS, and silver staining). Special stains are used depending on the pathology sought. Sections intended for IHC study are treated with fluorochrome-conjugated antibodies: immunoglobulins (mainly IgG, IgM and IgA), complement components (mainly C3, C1q and C4), fibrin and the light chains kappa and lambda. Additional antibodies may be required under specific circumstances. Sections intended for study in ME are stained with toluidine blue. After sampling and staining, the pathological examination provides useful diagnostic information.

In addition to these classical techniques, new techniques have been developed for diagnostic and research purposes. These are non-morphological techniques, polymerase chain reaction (PCR) viral (cytomegalovirus, BK virus) techniques that reveal the ribonucleic acid (RNA) ribosomal of bacteria from fresh or frozen samples. Vibrational spectrometry for the study of crystals. Mass spectrometry after microdissection of areas of interest, to characterize the spectrum of amyloid deposits and determine the type of amyloid precursor protein. Microarrays for the diagnosis of humoral and cellular rejection.

It is essential for the clinician to be familiar with all of these techniques that can be carried out using renal biopsy cores and the management modalities adapted to each type of technique.

The objective of our work is to detail the different technical modalities (conventional and special techniques) used for the anatomopathological study of renal biopsy.

الملخص

العنوان: خزعة الكلى : تقنيات التشريح الدقيق (دراسة الأنسجة التقليدية والتقنيات الخاصة

المؤلف: الزيواني مريم

المقرر: الأستاذة الدكتورة رواس لمياء

الكلمات الأساسية: خزعة الكلى ، التألق المناعي، الفحص المجهرى البصري ، المجهر الإلكتروني ، البروتينات

خزعة الكلى هي أداة تشخيصية لا غنى عنها للأطباء. ويتم إجراؤها خصيصا في حالة المتلازمة الكلوية والفشل الكلوي السريع التدريجي وغيرها ... يمكن إجراؤها عن طريق الجلد ، عن طريق الوريد أو جراحياً. يجب أن تكون المادة المنزوعة كافية (2 إلى 3 أسطوانات) لإجراء فحص أمثل. و يتم بعد ذلك إرسال عينات الخزعة إلى المختبر للتقسيم والدراسة التشريحية المرضية الأجزاء المعدة للدراسة بالمجهر الضوئي يتم تثبيتها ، تجفيفها، غمسها في البارافين ثم تقطيعها و تلويها ، بالمونات

الرئيسية (الهيماتوكسيلين يوزين، ترايكروم ماسون، التلوين الفضي، حمض شيف الدوري) يمكن استخدام ملونات خاصة حسب الحالة المرضية المطلوب درستها. بنسبة للأجزاء المخصصة لدراسة المكونات المناعية، يتم إضانتها من خلال قرنها بالفلوروكروم المضادات المستعملة لهذه التقنية هي: الغلوبولين المناعي والمكونات التكميلية (س 1، س4، س3) وسلاسل الضؤ الفيبرين والكابا ولامدا. قد تكون هناك حاجة إلى أجسام مضادة إضافية في ظل ظروف معينة. الأقسام المخصصة للدراسة في المجهر الإلكتروني يتم تلويها بأزرق التلويدين. بعد أخذ العينات وتلويها ، تمكن الملاحظة المجهرية من توفير معلومات تشخيصية مفيدة.

بالإضافة إلى هذه التقنيات الكلاسيكية ، تم تطوير تقنيات جديدة لأغراض التشخيص والبحث. هذه تقنيات غير شكلية ، مثل تفاعل البلمرة المتسلسل الفيروسي (مثل الفيروس المضخم للخلايا ، فيروس ب ك) التي تكشف عن ريبوسوم الحمض النووي الريبي للبيكتيريا من العينات الطازجة أو المجمدة. قياس الطيف الاهتزازي لدراسة البلورات. قياس الطيف الكتلي بعد التسليخ المجهرى لمناطق معينة ، لتوصيف طيف رواسب الأميلويد وتحديد نوع البروتين السلائف أميلويد. المصفوفات الدقيقة لتشخيص الرفض الخلطي والخلوي.

من الضروري أن يكون الطبيب على دراية بكل هذه التقنيات التي يمكن إجراؤها باستخدام عينات خزعة الكلى وطرق الإدارة المتوافقة مع كل نوع من التقنيات.

الهدف من عملنا هو تفصيل الطرائق التقنية المختلفة (التقنيات التقليدية والخاصة) المستخدمة في الدراسة التشريحية المرضية لخزعة الكلى



ANNEXE

Annexe I :

❖ Hématéine-Eosine-Safran (HES)

- PRINCIPE :

Coloration trichromique : au double coloration, nucléaire et cytoplasmique, par l'hémalum et la phloxine s'ajoute une coloration du collagène du tissu conjonctif par le safran

C'est la plus utilisé de toutes les colorations topographiques.

- PROCÉDÉ OPÉRATOIRE:

La coupe, déparaffinée, est amenée à l'eau courante.

- Colorer par l'Hémalum de Mayer pendant 5 minutes
- Laver à l'eau courante
- Différencier dans un mélange alcool-acide* (rapidement)
- Laver à l'eau courante
- Bleuir dans une solution aqueuse saturée de carbonate de lithium
- Rincer à l'eau courante
- Colorer dans une solution aqueuse à 1% érythrosine pendant 10 secondes
- Rincer à l'eau courante
- Différencier dans de l'alcool à 95°
- Passer dans 2 bains d'alcool à 100°
- Colorer par le safran** en solution alcoolique pendant 4 min
- Passer très rapidement dans l'alcool 100°
- Toluènes, montage à l'Eukitt

RÉSULTATS :

- Noyaux..... : bleu
- Cytoplasmes..... : roses
- Collagène.....: jaune d'or
- Mucus, substance fondamentale du cartilage ou de l'os : jaune d'or
- Fibre musculaire :rouge vif
- Hématies : rouge vif
- Lames élastiques : roses

PRÉPARATION DES RÉACTIFS :

*mélange alcool-acide :

- Alcool à 70° : 1000 ml
- Acide chlorhydrique.... : 10ml

**safran :

Faire sécher pendant 24h, dans une étuve à 60°C, 20gr de safran du gâtinais de l'année. Pulvériser au mortier. Mettre dans 1 litre d'alcool absolu et placer à l'étuve à 60°C en agitant de temps à autres. Le produit est utilisable 2 jours après. La conservation est indéfinie.

❖ TRICHROME DE MASSON :

FIXATION :

Tous les fixateurs habituels sont utilisables

RÉACTIFS :

- Rouge de Mallory :

Fuchsine s acide.....1g

Orange G.....0.4g

Acide acétique glacial.....1ml

Eau distillée.....300ml

- Solution de carbonate de lithium :

Carbonate de lithium à saturation dans de l'eau distillée

- Acide phosphomolhybdique 1%

Acide phosphomolhybdique.....1g

Eau distillé.....100ml

- Vert lumière

Vert lumière1g

Acide acétique glacial.....1ml

Eau distillée.....100ml

Diluer la solution obtenue au ½ au moment de l'emploi avec de l'eau distillée

MODE OPÉRATOIRE :

Déparaffinage : cf procédure déparaffinage

Hydratation à l'eau courante : 5mn
Hématoxyline de Harris : 1 mn
Rincer eau courante : 2mn
Bleuir dans la solution de carbonate de lithium : 1 mn
Eau courante : 2mn
Rouge de Mallory : 5 mn
Rincer à l'eau distillée et non à l'eau courante
Acide Phosphomolybdique 1% : 5mn
Enlever le réactif ne pas laver
Vert lumière dilué : 5mn
Rincer à l'eau distillée
Déshydratation, montage : cf procédure déshydratation, montage

RÉSULTATS :

Noyaubleu
Cytoplasme..... rose
Collagènevert clair

❖ **P.AS** (Réaction de l'acide périodique schiff)

PRINCIPE :

Un agent oxydant, l'acide périodique, rompt les liaisons entre 2 carbones de certains groupes chimiques en faisant apparaître des aldéhydes. Ces aldéhydes sont visualisés par le réactif SCHIFF (fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux) qui forme avec eux un produit de condensation de coloration

PROCÉDÉ OPÉRATOIRE :

La coupe, déparaffinée, est amenée à l'eau distillée
Placer dans une solution aqueuse à 0, 5% d'acide périodique pendant 5 min

Laver à l'eau distillée

Placer dans le réactif de SCHIFF* pendant 15 min

Rincer énergiquement à l'eau distillée

Laver à l'eau courante

Colorer les noyaux par l'hémalum pendant 1 minute. Laver à l'eau etc..

Alcools, toluènes, montage

RÉSULTATS :

Les substances réactives sont colorées en rouge violacé plus ou moins intense

Mucopolysaccharide neutres : PAS+

Glycoprotéines :

Collagène..... : faiblement PAS+

Réticulline vraie... : Nettement PAS+

Basales..... : nettement PAS+

PRÉPARATION DES RÉACTIFS :

- Réactifs SCHIFF :
 - Dissoudre : fuchsine basique ...:1 gr
 - Dans de l'eau distillée bouillante : 200ml
 - Agiter fortement et laisser bouillir quelques minutes
 - Refroidir à 50°, filtrer
 - Ajouter au filtrat HCl 1N.....20ml
 - Refroidir à 25°
 - ajouter : métabisulfite de sodium.....1gr
 - laisser reposer la solution, à l'obscurité et à +4° pendant 24heure, dans un flacon parfaitement nettoyé et bien fermé.
 - ajouter : charbon activé..... : 2 gr
 - Agiter et filtre (sur filtre sans cendre)
 - Le filtrat doit être parfaitement limpide et incolore
 - Conserver à l'obscurité, en flacon brun, au réfrigérateur

❖ **RETICULINE** : (technique de jones modifié)

PRINCIPE :

Mise en évidence en noir des membranes basales, tubulaires et capillaires ainsi que la matrice mésangiale.

PROCÉDÉ OPÉRATOIRE :

Déparaffiner pendant 20 minutes, passé dans 4 alcools puis amener à l'eau courante.

Rincer à l'eau courante

Rincer à l'eau distillée

Recouvrir d'acide périodique à 1% pendant 30 minutes

Rincer à l'eau distillée

Plonger dans la solution d'argent-méthénamine * 60°C pendant 40 à 45 minutes

Le temps est très variable. Vérifier l'imprégnation au microscope

Rincer à l'eau distillée

Passer dans le chlorure d'or à 0.2%

Rincer à l'eau distillée

Recouvrir par le thiosulfate de sodium à 5% pendant 5 minutes

Rincer à l'eau distillée

Alcools, toluènes, montage à l'Eukitt

PRÉPARATION DES RÉACTIFS :

- Solution d'argent méthénamine :

A)- Solution mère :

Mélanger :

- Solution aqueuse à 3% d'hexaméthylénetétramine..... : 100ml
- Solution aqueuse à 5% de nitrate d'argent..... : 5ml

Il se forme un précipité blanc qui dissout immédiatement par agitation

Cette solution se conserve pendant des mois au réfrigérateur à l'abri de la lumière

- Préparation pour un litre de solution :

- Prendre un litre d'eau distillée

- Prélever 50 ml et y dissoudre 2,5 gr de nitrate d'argent
- Dissoudre, en remuant, 30gr d'hexaméthylénetétramine dans 950ml restant
- Ajouter les 50 ml de nitrate d'argent

B)-Solution de travail :

Mélanger au moment de l'emploi :

Solution aqueuse à 5% de borax..... : 10ml

Eau distillée 25ml

Et après dissolution :

Solution-mère d'argent-méthénamine..... :25ml

Mettre la solution à 60°C 30 minutes avant d'y placer les lames

❖ **RÉTICULINE DE JONES :**

Coupe 2µm

I.FIXATION :

AFA, FORMOL, Bouin

II.REACTIFS

- Acide périodique à 5%
 - Acide périodique 5g
 - Eau distillée.....100ml
- Chlorure d'or à 0,2%
 - Chlorure d'or..... 0,2 g
 - Eau distillée.....100ml
- Solution d'uranyle formol
 - Formol 35%.....2ml
 - Nitrate d'uranyle à 1%.....6.2ml
 - Eau distillée.....192ml
- Solution d'acide oxalique formol
 - Acide oxalique4g
 - Formol 3%.....2ml
 - Eau distillée.....198ml
- Nitrate d'uranyle 1%
 - Nitrate d'uranyle.....1g
 - Eau distillée.....100ml
- Thiosulfate de sodium à 5% (hyposulfite de sodium)
 - Thiosulfate de sodium.....5g

- Eau distillée.....100ml
- Nitrate d'argent
 - Nitrate d'argent.....0.5g
 - Eau distillé.....5ml
- Hydroxyde de sodium : soude (NAOH) à 3%
 - Hydroxyde de sodium : soude En pastille 3g
 - Eau courante100ml
- Kernechtrot (rouge nucléaire, rouge neutre) stockage à +4°C
 - Kernechtrot.....0,2g
 - Sulfate d'aluminium.....5g
 - Eau distillée.....100ml
 - Dissoudre en chauffant, refroidir, filtrer, conserver à 4°
- Solution de foot : à refaire tous les lundis et à stocker à +4°C
 - Nitrate d'argent (Ag No3) à 10%.....5ml
 - Ajouter goutte à goutte, en agitant de l'ammoniaque 20% (il apparait un précipité noir)
 - Continuer à ajouter de l'ammoniaque jusqu'à ce que la solution devienne incolore. Ceci doit être fais à la goutte prés.
 - Toujours en agitant ajouter 5ml de soude à 3%, un précipité noir apparaitre a nouveau
 - ajouter de l'ammoniaque goutte a goutte jusqu'a la disparition de précipité
 - Filtrer la solution
 - Compléter avec de l'eau distillée à 50ml

III.MODE OPERATOIRE :

Déparaffinage : cf procédure déparaffinage

Hydratation à l'eau courante : 10mn

Acide périodique 5% :15mn

Eau courante : 10mn

Solution de foot : 35s

Alcool95° : bien rincer la lame avec la pissette d'alcool 95°

Solution de nitrate d'uranyle formol : 35s (coloration marron)

Eau distillée : rincer avec la pissette d'eau distillée

Eau courante : 10 mn

Différenciation au chlorure d'or : mettre du chlorure d'or sur les lames une à une jusqu'à disparition de la teinte dorée (coloration) gris clair) : arrêter en rinçant les lames à l'eau distillée

A ce stade les contours des coupes doivent rester très nettement dessinés mais il ne doit plus rester de marron à l'intérieur des cellules.

Acide oxalique formol : 2mn

Eau distillée : rincer avec pissette d'eau distillée
 Thiosulfate de sodium : 2s
 Eau distillée : rincer avec la pissette d'eau distillée
 Eau courante : 10mn
 Contre coloration kernechtrot : 3 à 5 mn
 Eau courante : 2 mn
 Déshydratation montage : cf procédure déshydratation montage

IV.RESULTATS :

Fibres de réticuline : noir intense
 Fibre de collagène : brun pourpre léger
 Noyaux : rouges

❖ MARRINOZZI

I.REACTIFS:

- Acide périodique: 0.5%
 Acide périodique:.....0.5g
 Eau distillée.....100ml
- Borax : 5%
 Tetraborate de di sodium.....5g
 Eau distillée.....100ml
 Mettre le réactif quelques heurs à l'étuve à 37° pour faciliter la dissolution
- Hexaméthylénetetramine : 3%
 Hexaméthylénetetramine.....6g
 Eau distillée.....200ml
- Nitrate d'argent à5%
 Nitrate d'argent.....0.5g
 Eau distillée.....10ml
- Solution mère (se conserve à4) est la même que la solution mère du Grocott
 Hexaméthylénetetramine à3%200ml
 Nitrate d'argent à5%.....10ml
- Solution de travail : à préparer extemporanément et à préchauffer 30min à 56°
 Solution mère..... 25ml
 Eau distillée.....25ml
 Borax 5%.....10ml

- Chlorure d'Or : 0.2%
Chlorure d'or..... 0.2g
Eau distillée.....100ml
 - Hyposulfite de sodium ou thiosulfate de sodium : 2%
Hyposulfite de sodium ou thiosulfate de sodium2g
Eau distillé.....100ml
 - Kernechtrot (rouge nucléaire, rouge neutre)
Kernechtrot.....0.2g
Sulfate d'aluminium.....5g
Eau distillée.....100ml
- Dissoudre en chauffant, refroidir, filtrer, conserver à 4°

III.MODE OPERATOIRE

Déparaffinage : cf procédure déparaffinage

Hydratation a l'eau courante : 5mn

Acide périodique0.5% : 30mn

Rincer à l'eau courante 2mn puis à l'eau distillée

Solution de travail : environ 45mn à 56°

Les coupes doivent être chamois. (Laisser en peu plus si la couleur est trop claire, surveiller toutes les 5mn)

Laisser refroidir (La coupe fonce en refroidissant)

Rincer à l'eau distillée puis à l'eau courante : 1mn

Virer avec le chlorure d'Or 0.2% : quelques secondes (de 5s à 1mn) les coupes sont grises

Rincer à l'eau distillée puis à l'eau courante pendant une minute

Hyposulfite de sodium ou thiosulfate de sodium 2% : 1min

Rincer à l'eau courante : 3min

Kernechtrot : 1min

Rincer à l'eau courante : 1min

Déshydratation, montage : cf procédure déshydratation montage

❖ ROUGE CONGO

❖ ROUGE CONGO WRIGHT

Coupe à 4µm

Il faut 2 lames par bloc : une pour le rouge Congo et une pour le rouge Congo Wright

Ne pas oublier de faire un témoin positif

I. REACTIFS :

- Alcool-Hcl
 - Alcool absolu.....920ml
 - Acide chloridrique HCL 1N.....80ml
- Ethanol 80%
 - Ethanol 95°100ml
 - Eau distillée 21ml
- Soude 1%
 - Hydroxyle de sodium ou soude1g
 - Eau distillée..... 100ml
- Rouge Congo solution mère à faire extemporanément :
 - Chlorure de sodium NaCl.....1g
 - Rouge congo1g
 - Ethanol80%..... 50ml

Filtrer la solution mère

- Rouge Congo solution de travail à faire extemporanément :
 - Rouge Congo solution mère50ml
 - Soude1%..... 0,5mlUtiliser dans les 15min
- Acide sulfurique à 0,3%
 - Acide sulfurique..... 0,15ml
 - Eau distillée100ml
- Permanganate de potassium à 5%
 - Permanganate de potassium.....5g
 - Eau distillée100ml
- Solution de travail du permanganate : (2ml par lame)
 - Permanganate de potassium 5%.....1ml
 - Acide sulfuriqueà 0,3.....1ml

1.01641.0001

Microscopie

Kit de coloration Rouge Congo

Kit pour la mise en évidence de l'amyloïde selon Highman



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Le présent « Kit de coloration Rouge Congo - Kit pour la mise en évidence de l'amyloïde selon Highman » est utilisé pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et sert à l'examen histologique d'échantillons d'origine humaine. C'est un kit de coloration prêt à l'emploi, qui est utilisé conjointement avec d'autres diagnostics in vitro de notre portefeuille pour rendre des structures cibles analysables pour le diagnostic (par fixation, inclusion, coloration, contre-coloration, montage) dans des épreuves histologiques, telles que les coupes histologiques de rein, intestin, foie, p. ex.

Le présent Kit de coloration Rouge Congo - Kit pour la mise en évidence de l'amyloïde selon Highman contient tous les réactifs nécessaires à la coloration de l'amyloïde dans les tissus histologiques.

Principe

L'amyloïde est une structure homogène et apte à être colorée de manière éosinophile, constituée de fibrilles protéiques (Ø de 8 - 15 nm chacune), qui se dépose entre les cellules, par exemple dans le cas de l'amylose. Tous les dépôts amyloïdes contiennent des fibrilles protéiques analogues qui résistent aux mécanismes de défense immunitaire de l'organisme et ne peuvent plus être enlevées.

La coloration au rouge Congo fonctionne sur la base de liaisons hydrogènes au composant d'hydrate de carbone du substrat. Le rouge Congo est un colorant anionique pouvant se déposer dans les fibrilles amyloïdes qui présentent ainsi un dichroïsme visible dans la lumière polarisée. Le tissu coloré au rouge Congo apparaît en rouge orangé à la lumière transmise mais à la lumière polarisée les dépôts amyloïdes se présentent comme une biréfringence en vert vif sur fond sombre. Par contre, d'autres matières également colorées au rouge Congo, telles que le collagène, ne sont pas visibles à la lumière polarisée.

La coloration peut être difficile du point de vue technique si les coupes de paraffine utilisées sont trop fines ou si le tissu est recoloré trop fortement.

Matériel d'échantillons

Des coupes de tissu fixé à la formaline et inclus en paraffine sont utilisés comme matériel de départ (coupes de paraffine de 5 à 6 µm d'épaisseur).

Réactifs

Art. 1.01641.0001
Kit de coloration Rouge Congo
Kit pour la mise en évidence de l'amyloïde selon Highman

Composition d'emballage :

Le kit de coloration contient

Réactif 1 : Kit de coloration Rouge Congo Solution de Rouge Congo 100 ml
Réactif 2 : Kit de coloration Rouge Congo Solution de KOH 2x 100 ml

Nécessaire en plus :

Art. 105174 Hématoxyline en solution modifiée selon Gill III 500 ml, 1 l, 2,5 l pour la microscopie
Art. 105175 Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II 500 ml, 2,5 l pour la microscopie

Préparation des échantillons

Le prélèvement d'échantillons doit être effectué par du personnel qualifié. Tous les échantillons doivent être traités conformément aux règles de l'art. Tous les échantillons doivent être clairement identifiés. Utiliser des instruments appropriés pour le prélèvement d'échantillons et la préparation, respecter les instructions du fabricant pour l'emploi / l'utilisation. Déparaffiner et réhydrater les coupes de la manière habituelle.

Préparation du réactif

Les réactifs de Kit de coloration Rouge Congo - Kit pour la mise en évidence de l'amyloïde selon Highman utilisés pour colorer sont prêts à l'emploi ; il n'est pas nécessaire de diluer les solutions étant donné que cela réduit le résultat de coloration et la stabilité.

Le Réactif 2 (solution de KOH) peut encore être utilisé et donné de bons résultats même s'il est teinté en rose. La solution de KOH déjà utilisée peut être reversée dans le flacon PE.

Mode opératoire

Coloration dans la cuve de coloration

Déparaffiner les préparations histologiques de la manière habituelle et les réhydrater par une série d'alcools à concentration décroissante.

Les lames porte-objets doivent être égouttées conformément aux procédures de coloration pour éviter tout transfert non nécessaire des solutions.

Pour obtenir un résultat de coloration optimal, il convient de respecter les durées indiquées.

Porte-objet avec préparation histologique	
Eau distillée	1 minute
Solution d'hématoxyline modifiée selon Gill II ou Solution d'hématoxyline modifiée selon Gill III	5 minutes
Eau du robinet courante	5 minutes
Réactif 1 (solution de Rouge Congo)	10 minutes
Eau du robinet courante	5 minutes
Réactif 2 (solution de KOH)	30 - 40 secondes
Eau du robinet courante	5 minutes
Ethanol 96 %	30 secondes
Ethanol 96 %	30 secondes
Ethanol 100 %	1 minute
Ethanol 100 %	1 minute
Xylène ou Neo-Clear®	5 minutes
Xylène ou Neo-Clear®	5 minutes
Monter les préparations humides de Neo-Clear® avec le Neo-Mount® ou les préparations humides de xylène avec p. ex. l'Entellan® néo et couvre-objet.	

Après avoir été déshydratées (passage dans des alcools à concentration croissante) et clarifiées dans du xylène ou du Neo-Clear®, les préparations histologiques peuvent être montées avec des produits de montage anhydres (p. ex. Neo-Mount®, Entellan®, DPX néo ou Entellan® néo) et une lamelle couvre-objet et être conservées.

Pour l'examen microscopique de préparations colorées avec un grossissement >40x, il est recommandé d'utiliser de l'huile d'immersion.

Résultat

Noyaux cellulaires	bleu foncé
Amyloïde en lumière transmise dans la lumière polarisée	rose à rouge métachromasie verte
Tissus conjonctifs, collagène	rouge clair

Diagnostic d'erreurs

Coloration trop faible des fibrilles amyloïdes

La coloration peut avant tout s'avérer difficile du point de vue technique si des coupes de paraffine de moins de 5 µm sont utilisées, puisqu'il n'y a plus assez d'amyloïde pour intercaler le rouge Congo. Ceci peut fournir des résultats faussement négatifs. Il conviendrait donc de colorer des coupes de paraffine de plus de 5 µm.

En cas d'incubation trop intensive à l'éthanol pour la déshydratation, il se peut que le colorant rouge Congo disparaisse du tissu au lavage et que la préparation soit décolorée. Les temps de déshydratation indiqués au procès-verbal devraient être respectés avec précision pour éviter les résultats faussement négatifs.

Remarques techniques

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux et comporter un équipement de polarisation.

En cas d'utilisation des processeurs d'histologie ou des automates de coloration, se conformer aux instructions du fabricant de l'appareil et du logiciel. Éliminer l'excédent d'huile pour immersions avant l'archivage.

Diagnostic

Les diagnostics doivent être exclusivement effectués par des personnes autorisées et formées. Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées. Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes reconnues. Chaque étape doit être effectuée sous contrôle (p. ex. ISOSLIDE® Rouge Congo, art. 1.0251.0001), afin d'exclure toute possibilité de résultat erroné. Pour identifier l'amyloïde avec certitude, il faut toujours effectuer une vérification à la lumière polarisée pour confirmer le résultat obtenu en lumière transmise.

Stockage

Stocker le Kit de coloration Rouge Congo - Kit pour la mise en évidence de l'amyloïde selon Highman entre +15 °C et +25 °C.

Stabilité

Le Kit de coloration Rouge Congo - Kit pour la mise en évidence de l'amyloïde selon Highman peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée.

Après la première ouverture du flacon, conserver entre +15 °C et +25 °C et utiliser jusqu'à la date de péremption.

Le Réactif 2 (solution de KOH) peut encore être utilisé et donné de bons résultats même s'il est teinté en rose.

La solution de KOH déjà utilisée peut être reversée dans le flacon PE.

Les flacons doivent toujours être conservés bien fermés pour éviter que l'alcool s'évapore et par conséquent la concentration du colorant augmente.

Capacité

L'emballage suffit jusqu'à 50 applications.

Remarques sur l'utilisation

Réservé à une utilisation professionnelle.

Pour éviter les erreurs, l'application doit être effectuée par un personnel qualifié.

Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à l'assurance de la qualité.

Utiliser des microscopes équipés conformément au standard.

Protection contre les infections

Veiller impérativement à une protection efficace conformément aux directives des laboratoires.

Consignes d'élimination

Éliminer l'emballage conformément à la réglementation en vigueur.

Les solutions usagées et les solutions dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets dangereux, en respectant les directives locales relatives à l'élimination des déchets. Pour commander les instructions sur l'élimination des déchets, cliquer sur le Quick Link « Hints for Disposal of Microscopy Products » sur www.microscopy-products.com. Au sein de l'UE s'applique le règlement CE n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1989/45/CE et modifiant le règlement (CE) N° 1907/2006.

Réactifs auxiliaires

Art. 100496	Formaldéhyde en solution 4%, tamponnée, pH 6,9 (formaline en solution à env. 10%) pour l'histologie	350 ml et 700ml (en flacon à col large), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Art. 100579	DPX néo produit de montage anhydre pour la microscopie	500 ml
Art. 100869	Neo-Entellan® pour colleuse de lamelles pour la microscopie	500 ml
Art. 100974	Ethanol dénaturé avec env. 1 % d'éthylméthylcétone pour analyse EMSURE®	1 l, 2,5 l
Art. 102561	ISOSLIDE® Rouge Congo Lames de contrôle avec tissu de référence pour la détection de structures de l'amyloïdes dans les tissus histologiques	25 tests
Art. 103699	Huile pour immersion selon ISO 8036 pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml
Art. 104699	Huile pour immersions pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 105174	Hématoxyline en solution modifiée selon Gill III pour la microscopie	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 105175	Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II pour la microscopie	500 ml, 2,5 l
Art. 107961	Entellan® néo produit de montage rapide pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 108298	Xylène (mélange isomérique) pour l'histologie	4 l
Art. 109016	Neo-Mount® agent de montage anhydre pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 500 ml
Art. 109643	Neo-Clear® (remplaçant du xylène) pour la microscopie	5 l
Art. 111609	Histosec® en pastilles P.S. 56-58°C agent d'inclusion pour l'histologie	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 115161	Histosec® en pastilles (sans DMSO) P.S. 56-58°C agent d'inclusion pour l'histologie	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg

Classification des matières dangereuses

Art. 1.01641.0001

Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité. La fiche de données de sécurité est disponible sur le site web et sur demande.

Composants principaux des produits

Art. 1.01641.0001

Réactif 1
C.I. 22120 10 g/l
C₂H₅OH 390 g/l
1 l = 0,83 kg

Réactif 2

KOH 5,69 g/l
C₂H₅OH 749 g/l
1 l = 0,84 kg

Autres produits d'IVD

Art. 100362	Kit d'argenture selon von Kossa pour la détection de la microcalcification	1 set
Art. 100485	Kit de coloration selon Masson-Goldner pour la représentation du tissu conjonctif par la coloration trichrome	1 unit
Art. 101646	Kit de coloration PAS pour la détermination d'aldehydes et de muco-substances	2x 500 ml
Art. 102472	ISOSLIDE® Warthin-Starry Lames de contrôle avec tissu de référence pour la détection de Helicobacter pylori et Spirochetes dans les tissus histologiques	25 tests
Art. 102560	ISOSLIDE® AFB Lames de contrôle avec tissu de référence pour la détection de mycobactéries dans les tissus histologiques	25 tests

Littérature

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A.), Bios, 2002



Consult instructions for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult accompanying documents



Use by YYYY-MM-DD



Temperature limitation

Status: 2018-10-29

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321





Oil Red'O

Principe

D'après ¹

Cette technique permet d'identifier, sur coupes en congélation obtenues à partir de pièces « fraîches » ou fixées en fixateur non alcoolique, des lipides hydrophobes en phase liquide. Le corps coloré appelé **lysochrome**, se déplace du solvant dans lequel il se trouve vers le lipide tissulaire.

Réactifs

Alcool isopropylique à 60% dans l'eau distillée

Oil Red'O

Solution mère à 0,5 % dans l'alcool isopropylique pur

Solution de travail

- Mélanger 6 ml de la solution mère avec 4 ml d'eau distillée.
- Laisser reposer 1 h 00 à 24 h 00 maximum.
- Filtrer au moment de l'emploi.

Hématoxyline de MAYER

Solution aqueuse saturée d'alun de potassium (\cong 2%)	1000ml
Hématéine (CI 75290)	2 g
Acide Acétique	20 ml

- Faire bouillir la solution d'alun de potassium.
- Arrêter le chauffage et ajouter au liquide bouillant l'hématéine.
- Laisser bouillir à nouveau pendant 5 minutes.
- Refroidir
- Filtrer.
- Ajouter l'acide acétique

Résultats

- Les noyaux sont bleus
- Les gouttelettes lipides sont rouges

¹ Histochimie normale et pathologique - Ganter



Oil Red'O

Technique

Fixation de la coupe recueillie en eau distillée

- En alcool isopropylique à 60 % 1 min

Coloration

- Colorer dans la solution de travail d'Oil Red'O 10 min
- Rincer en alcool isopropylique à 60 % 30 s
- Rincer délicatement en eau distillée.
- Colorer en hémalum 30 s
- Rincer délicatement en eau distillée.

Montage

- Coller une lamelle avec un liquide de montage aqueux.

❖ CRISTAL-VIOLET

Coupe à 4 μ

Remarque : violet de gentiane= violet de paris = cristal violet

I. REACTIFS :

- Cristal_violet :
 - Cristal-violet1.4g
 - Alcool 95°10ml
 - Eau distillée.....300ml
 - Acide chlorhydrique 37%.....1ml

II. MODE OPERATOIRE :

Déparaffinage : cf procédure déparaffinage
Hydratation : 5mn à l'eau courante
Cristal violet 3 à 4 min
Rinçage à l'eau courante rapidement
Séchage des lames à l'air (ne pas passer dans l'alcool)
Méthylcyclohexane
Montage : cf procédure montage

III. RESULTATS :

Amylose : violet

❖ Orcéine :

Principe :

L'orcéine est un colorant acide faible qui se fixe avec une grande électivité sur les fibres et lames élastiques.

Réactifs :

➤ Orcéine

Orcéine..... 1 g
Éthanol à 70%100 ml
HCl concentré (d =1,19)..... 0,6 ml

➤ Acide/alcool

➤ HCl concentré à 1% dans l'alcool éthylique à 70%

➤ **Rouge nucléaire ou Kernerchtrot (CI 60760)**

Poudre de rouge nucléaire2 g
Sulfate d'aluminium50 g
Eau distillée..... 1000 ml

- Dissoudre le sulfate d'aluminium dans l'eau distillée, jusqu'au bouillonnement.
- Attendre environ 5 min avant d'ajouter le rouge nucléaire.
- Agiter doucement : le liquide devient trouble.
- Remettre à chauffer jusqu'à éclaircissement de la solution sans faire bouillir. Laisser refroidir.
- Filtrer.
- Conserver à 4°C (1 mois).

Résultats :

- Fibres élastiques : brun acajou
- Noyaux et cytoplasmes : rouge à rose

Technique :

Déparaffinage des lames :

Plonger la lame dans trois bains de xylène en agitant 3 x 5 min

Plonger dans deux bains d'alcool absolu en agitant les lames 2 x 3 min

Coloration :

- Colorer à l'Orcéine 30 à 60 min
- Rincer à l'eau courante
- Plonger les lames dans un bain d'alcool absolu 10 min

Les coupes deviennent brunes.

- **Contrôler au microscope** : les fibres élastiques sont brunes sur fond beige
- Plonger les lames dans un bain d'alcool/acide 2 à 10 min

Les coupes deviennent roses.

- **Contrôler au microscope** : les fibres élastiques sont brun-acaïou sur fond rose
- Rincer à l'eau courante pendant au moins 5 min.
- Contre colorer les coupes dans le bain de rouge nucléaire 5 min
- Rincer et déshydrater.

Xylène et montage :

Plonger dans trois bains de xylène en agitant la lame

Monter sous lamelle à l'aide de résine.

❖ VON KOSSA

Protocole de coloration de von Kossa pour le calcium

Kits de teinture spéciale NovaUltra

Description: Cette technique permet de mettre en évidence des dépôts de calcium ou de sel de calcium, elle n'est donc pas spécifique de l'ion calcium lui-même. Dans ce procédé, les coupes de tissu sont traitées avec une solution de nitrate d'argent et l'argent est déposé en remplaçant le calcium réduit par la forte lumière, et ainsi visualisé sous forme d'argent métallique.

Fixation: coupes de tissu fixées au formol, incluses en paraffine ou coupes congelées fixées à l'alcool.

Solutions et réactifs:

Solution aqueuse de nitrate d'argent à 1%:

Nitrate d'argent ----- 1 g

Eau distillée ----- 100 ml

Thiosulfate de sodium à 5%:

Thiosulfate de sodium ----- 5 g

Eau distillée ----- 100 ml

Solution rouge rapide nucléaire à 0,1%:

Nucléaire rouge rapide ----- 0,1 g

Un sulfate de luminium ----- 5 g

Eau distillée ----- 100 ml

Dissoudre le sulfate d'aluminium dans l'eau. Ajouter le rouge nucléaire rapide et porter lentement à ébullition et refroidir. Filtrer et ajouter un grain de thymol comme conservateur.

Procédure:

1. Déparaffiner les coupes de paraffine et hydrater à l'eau.
2. Rincer à plusieurs reprises d'eau distillée.
3. Incuber les sections avec une solution de nitrate d'argent à 1% dans un bocal en verre transparent coplin placé sous lumière ultraviolette pendant 20 minutes (ou devant une ampoule de 60-100 watts pendant 1 heure ou plus). Remarque: si la tache était faible ou rincée au cours des étapes de lavage, cela indiquait que la lumière UV n'était pas assez forte. Une coloration plus longue est nécessaire jusqu'à plusieurs heures.
4. Rincer à plusieurs reprises d'eau distillée.
5. Retirer l'argent n'ayant pas réagi avec du thiosulfate de sodium à 5% pendant 5 minutes.
6. Rincer à l'eau distillée.
7. Contre-colorer avec du rouge nucléaire rapide pendant 5 minutes.
8. Rincer à l'eau distillée.
9. Déshydrater avec de l'alcool gradué et limpide dans le xylène.
10. Lamelle à l'aide d'un support de montage permanent.

Résultats:

Sels de calcium ----- noir ou brun-noir

Noyaux ----- rouge

Cytoplasme ----- rose

Contrôles positifs:

Embryon de souris de 16 à 18 jours, tissus contenant du calcium ou os non décalcifié

Remarques:

1. La lumière UV donne généralement une réaction plus forte, de sorte que les sels de calcium sont souvent colorés en noir. L'ampoule ordinaire de 60 à 100 watts donne généralement une réaction plus faible, de sorte que les sels de calcium sont souvent colorés en brun-noir.
2. On pense généralement que les sels d'oxalate donnent une coloration de von Kossa négative.
3. Un contrôle négatif peut être nécessaire en cas de doute que les dépôts noirs résultants sont du calcium. Cela se fait en traitant une lame de test dans de l'acide formique à 10% pendant 10 minutes avant l'étape 3. La lame de test doit montrer une réaction négative.

Références:

Sheehan D, Hrapchak B, Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Ed, 1980, pp 226-227, Battelle Press, Ohio

Remarques techniques

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux.
En cas d'utilisation d'un processeur d'histologie et d'un automate de coloration, se conformer aux instructions du fabricant de l'appareil et du logiciel. La solution de colorant extemporanément préparée doit être filtrée avant utilisation.

Éliminer l'excédent d'huile pour immersions avant l'archivage.

Diagnostic

Les diagnostics doivent être exclusivement effectués par des personnes autorisées et formées.
Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées.
Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes reconnues.
Chaque étape doit être effectuée sous contrôle, afin d'exclure toute possibilité de résultat erroné.

Stockage

Stocker Bleu de toluidine O (C.I. 52040) - pour la microscopie Certistain® entre +5 °C et +30 °C.

Stabilité

Bleu de toluidine O (C.I. 52040) - pour la microscopie Certistain® peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée.

Après la première ouverture du flacon, conserver entre +5 °C et +30 °C et utiliser jusqu'à la date de péremption.

Tenir les flacons toujours bien fermés.

Remarques sur l'utilisation

Réservé à une utilisation professionnelle.

Pour éviter les erreurs, l'application doit être effectuée par un personnel qualifié.

Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à l'assurance de la qualité.

Utiliser des microscopes équipés conformément au standard.

Protection contre les infections

Veiller impérativement à une protection efficace conformément aux directives des laboratoires.

Consignes d'élimination

Éliminer l'emballage conformément à la réglementation en vigueur.
Les solutions usagées et les solutions dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets dangereux, en respectant les directives locales relatives à l'élimination des déchets. Pour commander les instructions sur l'élimination des déchets, cliquer sur le Quick Link « Hints for Disposal of Microscopy Products » sur www.microscopy-products.com. Au sein de l'UE s'applique le règlement CE n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N° 1907/2006.

Réactifs auxiliaires

Art. 100974	Ethanol dénaturé avec env. 1 % d'éthylméthylcétone pour analyse EMSURE®	1 l, 2,5 l
Art. 103699	Huile pour immersion selon ISO 8036 pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml
Art. 104095	Glycérol pour la microscopie de fluorescence	250 ml
Art. 104699	Huile pour immersions pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 107961	Entellan® néo produit de montage rapide pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 108298	Xylène (mélange isomérique) pour l'histologie	4 l

Classification des matières dangereuses

Art. 1.15930.0025

Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité. La fiche de données de sécurité est disponible sur le site web et sur demande.

Composants principaux du produit

Art. 1.15930.0025
C.I. 52040
C₁₂H₁₀ClN₂S
M = 305,84 g/mol

Autres produits d'IVD

Art. 100362	Kit d'argenture selon von Kossa pour la détection de la microcalcification	1 set
Art. 100496	Formaldéhyde en solution à 4%, tamponnée, pH 6,9 (formaline en solution à env. 10%), pour l'histologie	350 ml et 700 ml (en flacon à col large), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Art. 105175	Hématoxyline en solution modifiée selon Gill II pour la microscopie	500 ml, 2,5 l
Art. 115161	Histosec® en pastilles (sans DMSO) P.S. 56-58°C agent d'inclusion pour l'histologie	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 117081	Fosine J - Solution à 1%, d'alcool pour la microscopie	1 l

Littérature

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mullisch, Maria, Weisch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A.) Bios, 2002



Consult instructions for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult accompanying documents



Use by YYYY-MM-DD



Temperature limitation

Status: 2019-08-12

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive
Burlington MA 01803, USA, Tel. +1-978-715-4321
Sigma-Aldrich Canada Co. or Millipore (Canada) Ltd.
2149 Winston Park, Dr. Oakville, Ontario, L6H 6J8
Phone: +1 800-565-1400



Annexe II :

Protocole général d'immunohistochimie (IHC) :

I. Matériels requis

Réactifs

- Un (ou plusieurs) anticorps primaire couplé(s) ou non et spécifiques de votre(s) molécule(s) d'intérêt
- Kit de révélation
- Chromogène

Tampons

- Xylène
- Bains d'alcool à 70%, 80% et 95%
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)
- Tris EDTA, Tris HCl
- Tween-20

Matériel

- Des pipettes et un Pipet-aid
- Bain-marie

II. Durée de l'expérimentation

- 10 mn de blocage des peroxydases
- 30 mn de démasquage antigénique
- 1 h d'incubation de l'anticorps laire
- 10 mn de chromogène
- 2 h de bains et de rinçages divers
- TOTAL : 4 heures

III. MODE OPERATOIRE :

- Déparaffiner la section dans 3 bains de xylène de 5 minutes chacun.
- Laver la section dans des bains d'alcool benzylique à 96 %, 80 % et 70 % pendant 5 minutes chacun.
- Rincer à l'eau distillée.
- Bloquer les peroxydases endogènes en incubant le tissu dans du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 3% pendant 10 min.
- Rincer à l'eau distillée.

- Pour démasquer l'antigène : immerger la lame dans du tampon Tris-EDTA buffer, pH 9.0, 0.05% Tween- 20*, et incuber à 95°C dans un bain-marie pendant 30 minutes. (Sinon adapter à votre protocole interne en gardant le pH requis)
- Sortir la lame à température ambiante et la laisser refroidir dans du tampon Tris-EDTA buffer, pH 9.0 pendant 15 min.
- Rincer à l'eau distillée.
- Laver dans du tampon Tris-Hcl 0,05 M (pH 7,6) avec 0,2 % de Tween-20 (Tampon A) pendant 5 minutes.
- Appliquer sur le tissu l'anticorps primaire dilué dans du tampon Tris-Hcl 0,05 M (pH 7,6) avec 0,05 % de Tween- 20 selon une dilution comprise entre 1/100 et 1/200 pendant 1 heure en chambre humide.
- Laver 2 fois pendant 5 minutes dans le tampon A.
- Appliquer l'anticorps secondaire (le protocole dépend du fournisseur) et appliquer le protocole standard d'immunohistochimie (HRP – Peroxyde – DAB).
- Laver 2 fois pendant 5 minutes dans le tampon A.
- Ajouter le chromogène (DAB), laisser 10 minutes.
- Rincer à l'eau.
- Colorer à l'hématoxyline pendant 5 minutes.
- Laver à l'eau pendant 10 minutes.
- Déshydrater le tissu dans 2 bains d'alcool benzylique à 96% pendant 5 minutes chacun.
- Laver le tissu dans 2 bains de xylène pendant 2 minutes chacun.
- Monter la lame pour l'observation.

Disponible sur : <http://www.ihcworld.com/>



REFERENCES

- [1] Lefaucheur C., Nochy D., Bariety J. Biopsie rénale : techniques de prélèvement, contre-indications, complications. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Néphrologie, 18-024-A-10, 2007
- [2] Henry N., Sèbe P. Anatomie des reins et de la voie excrétrice supérieure. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Néphrologie, 18-001-C-10, 2008.
- [3] LAURE-HÉLÈNE NOËL. ATLAS DE PATHOLOGIE RÉNALE 2008. Flammarion Médecine- Sciences. Pages 57-68 .Pages 27-35
- [4] <https://www.histology.be/atlas/HSH/general/right/HS-Uri-Rein.htm>
- [5] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.8.1.3.html#ID-107>
- [6] S. Dettwiller, S. moll. Apport de la biopsie rénale dans la prise en charge des pathologies rénales. Revues Méd. Suisse 2003 volume_1023429
- [7] Patrick D. walker. The renal biopsy. Arch Pathol Lab Med, 2009 Feb;133(2):181-8. doi: 10.1043/1543-2165-133.2.181.
- [8] Walker, P., Cavallo, T. & Bonsib, S. Practice guidelines for the renal biopsy. Mod Pathol 17, 1555–1563 (2004). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800239>
- [9] Jonathan J. Hogan, Michaela Mocanu, and Jeffrey S. Berns. The Native Kidney Biopsy: Update and Evidence for Best Practice. Clin J Am Soc Nephrol. 2016 Feb 5; 11(2): 354–362. Published online 2015 Sep 2. doi: 10.2215/CJN.05750515
- [10] Geoffrey Rolls. An introduction to specimen processing. disponible sur <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-specimen-processing/>
- [11] S K Agarwal , S Sethi, A K Dinda. Basic of kidney biopsy: nephropatologist's percpective. Indian J Nephrol. 2013 Jul;23(4):243-52. doi: 10.4103/0971-4065.114462.

- [12] Aryal, G., & Aryal, S. Approach to native medical renal biopsy interpretation of glomerular disease. *Journal of Pathology of Nepal*, (2019). volume 9 numero(2), 1571-1579. <https://doi.org/10.3126/jpn.v9i2.25664>
- [13] Nochy D., Lefaucheur C., Bariety J. Biopsie rénale : les différentes techniques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Néphrologie, 18-024-B-10, 2007.
- [14] Hervé RIGNEAULT. IMAGERIE MOLÉCULAIRE VIBRATIONNELLE un nouvel outil pour la biologie et la médecine. *Photoniques* Numéro 96, Mai-Juin 2019. Page :18-22. Dossier : Technique Raman. Publié en ligne : 22 juin 2019
- [15] Ihtesham ur Rehman, Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman. VIBRATIONAL SPECTROSCOPY FOR TISSUE ANALYSIS, Series in Medical Physics and Biomedical Engineering. 1st edition. Published September 27, 2012 by CRC Press. Pages 1-12
- [16] Prentice BM, Caprioli RM, Vuiblet V. Label-free molecular imaging of the kidney. *Kidney Int.* 2017;92(3):580-598. doi:10.1016/j.kint.2017.03.052
- [17] Michel Daudon a, Dominique Bazin. Vibrational spectroscopies to investigate concretions and ectopic calcifications for medical diagnosis. livre: *Comptes Rendus Chimie* Volume 19, Issues 11–12, November–December 2016, Pages 1416-1423. Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Académie des sciences.
- [18] Dasari S, Amin MS, Kurtin PJ, et al. Clinical, biopsy, and mass spectrometry characteristics of renal apolipoprotein A-IV amyloidosis. *Kidney Int.* 2016; 90(3):658-664. doi:10.1016/kid.int.2016.04.003
- [19] Sophie Liuu. Analyse protéomique ciblée à haute résolution : un outil puissant pour le diagnostic clinique à partir de prélèvements de tissus amyloïdes bruts. Thèse en Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01403464>

- [20] K. Jaton G. Greub. PCR en microbiologie : de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat. Rev Med Suisse 2007; volume 3. 32181
- [21] Alcina Frederica, Nicol Gerard, J.Nuovo. RT PCR in Situ: Protocols and Applications. Livre: Methods in Microbiology. Volume 34, 2004, Pages 239-254
- [22] Matthias A. Neusser, Maja T.Lindenmeyer, Matthias Kretzler, Clemens D.Cohen. Genomic analysis in nephrology- towards systems biology and systmatic medicine. livre: Néphrologie & Thérapeutique Volume 4, Issue 5, October 2008, Pages 306-311 PMID: 18586598 DOI: 10.1016/j.nephro.2008.04.003
- [23] Hybridation Comparative de Genome sur micropuce (CGH microarray) disponible sur le Site de l'institut de pathologies et de génétique <http://www.ipg.be/biologie-moleculaire/test-par-cgh-sur-micropuce/>
- [24] Halloran PF, Pereira AB, Chang J, et al. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). Am J Transplant. 2013; 13(11):2865-2874. doi:10.1111/ajt.12465
- [25] Renkema KY, Stokman MF, Giles RH, Knoers NV. Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2014; 10(8):433-444. doi:10.1038/Nat.Rev.neph.2014.95
- [26] Pr. Sekhesoukhe Y, Dr. nada Aghrouch. Séquencage de l'ADN : principe, indication, application. Thèse en Médecine N134, /2018.
- [27] El-Meanawy A, Mueller C, Iczkowski KA. Improving sensitivity of amyloid detection by Congo red stain by using polarizing microscope and avoiding pitfalls. Diagn Pathol. 2019; 14(1):57. Published 2019 Jun 14. doi:10.1186/s13000-019-0822-4
- [28] Hoane JS, Johnson CL, Morrison JP, Elmore SA. Comparison of Renal Amyloid and Hyaline Glomerulopathy in B6C3F1 Mice: An NTP Retrospective Study. Toxicol Pathol. 2016; 44(5):687-704. doi:10.1177/0192623316630625

- [29] Introduction to Fluorescence Microscopy. Disponible sur <https://www.Microscopyu.com>
- [30] Di augusto sciarra. Microscopia in fluorescenza altre tecniche. disponible sur : <https://www.fluorescencemicroscopy.it>
- [31] Sethi S, Nasr SH, De Vriese AS, Fervenza FC. C4d as a Diagnostic Tool in Proliferative GN. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26(11):2852-2859. doi:10.1681/ASN.2014040406
- [32] Said SM, Fidler ME, Valeri AM, et al. Negative Staining for COL4A5 Correlates With Worse Prognosis and More Severe Ultrastructural Alterations in Males With Alport Syndrome. *Kidney Int Rep.* 2016;2(1):44-52. Published 2016 Sep 29. doi:10.1016/j.ekir.2016.09.056
- [33] Hemminger J, Nadasdy G, Satoskar A, Brodsky SV, Nadasdy T. IgG Subclass Staining in Routine Renal Biopsy Material. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(5):617-626. doi:10.1097/PAS.0000000000000605
- [34] Safaa Asmandar a, Marie-Lucile Figuères a, Jean-Michel Goujon b, Laure-Hélène Noël a, Aurélie Hummel. Place de l'étude des sous-classes d'IgG dans les glomérulonéphrites extramembraneuses : à propos d'un cas. Livre : Néphrologie & Thérapeutique Volume 11, issue 3 pages 169-172 (juin 2015) Article EMC
- [35] Nasr Samih H et al. "DNAJB9 Is a Specific Immunohistochemical Marker for Fibrillary Glomerulonephritis." *Kidney international reports* vol. 3,1 56-64. 8 Aug. 2017, doi:10.1016/j.ekir.2017.07.017
- [36] VALERIE PARADIS, SOPHIE FERLICOT, ELIE GHANNAM, et all. CD44 IS AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR IN CONVENTIONAL RENAL CELL CARCINOMAS VALERIE PARADIS. Livre: The Journal of Urology Volume 161, Issue 6, June 1999, Pages 1984-1987
- [37] Larsen CP, Messias NC, Walker PD. B7-1 immunostaining in proteinuric kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2014; 64(6):1001-1003. doi:10.1053/j.ajkd.2014.07.023

- [38] Dalkilic E, Filiz G, Yavuz M, et al. Ki-67 proliferation index in renal biopsy samples of patients with systemic lupus erythematosus and its correlation with clinical findings. *Iran J Kidney Dis.* 2013; 7(3):198-203.
- [39] Koda R, Yoshino A, Imanishi Y, et al. Expression of tight junction protein claudin-1 in human crescentic glomerulonephritis. *Int J Nephrol.* 2014; 2014:598670. doi:10.1155/2014/598670
- [40] Zhou TB. Signaling pathways of PAX2 and its role in renal interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012; 32(6):298-303. doi:10.3109/10799893.2012.738231
- [41] Asfahani, Rowan I et al. “Activation of podocyte Notch mediates early Wt1 glomerulopathy.” *Kidney international* vol. 93,4 (2018): 903-920. doi:10.1016/j.kint.2017.11.014
- [42] M D. Kazatchkine, D T. Fearon, M D. Appay,C. Mandet, and J. Bariety Immunohistochemical Study of the Human Glomerular C3b Receptor in Normal Kidney and in Seventy-five Cases of Renal Diseases. Published in Volume 69, Issue 4 on April 1, 1982. *J Clin Invest.* 1982;69(4):900–912. <https://doi.org/10.1172/JCI110529>.
- [43] Jean M. Francis, Laurence H. Beck , and David J. Salant. Membranous Nephropathy: A Journey From Bench to Bedside. *Am J Kidney Dis.* 2016 Jul; 68(1): 138–147. Published online 2016 Apr 13. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.01.030
- [44] Faa G, Gerosa C, Fanni D, et al. CD10 in the developing human kidney: immunoreactivity and possible role in renal embryogenesis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(7):904-911. doi:10.3109/14767058.2011.599457
- [45] Faa G, Gerosa C, Fanni D, et al. The role of immunohistochemistry in the study of the newborn kidney. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 ;25 Suppl 4:135-138. doi:10.3109/14767058.2012.715018

- [46] Jiang Y, Wang R, Wang H, et al. The Effect of Histological CD20-Positive B Cell Infiltration in Acute Cellular Rejection on Kidney Transplant Allograft Survival. *J Immunol Res.* 2016;2016:7473239. doi:10.1155/2016/7473239
- [47] Kowalewska J, Okoń K, Szyńska B, Naumnik B. Expression of macrophage markers in cryoglobulinemic glomerulonephritis – a possible role of CXCL9. livre: *Advances in Medical Sciences* Volume 58, Issue 2, December 2013, Pages 394-400
- [48] Chaines légères libres d'immunoglobuline ou “ Proteine de Bence –jones” disponible sur https://www.eurofinsbiomnis.com/referentiel/liendoc/precis/CHAINES_LEGERES_LIBRES.pdf
- [49] V. Javaugue, L. Écotière, E. Desport1, et al. Pathophysiology of amyloidosis. disponible sur <https://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/22305.pdf>
- [50] Joy T, Wang J, Hahn A, Hegele RA. APOA1 related amyloidosis: a case report and literature review. *Clin Biochem.* 2003 ;36(8):641-645. doi:10.1016/s0009-9120(03)00110-3
- [51] Benson MD. LECT2 amyloidosis. *Kidney Int.* 2010;77(9):757-759. doi:10.1038/ki.2010.18
- [52] Julien Vionnet, Manuel Pascual, Thierry Kuntzer, Patrick Yerly, Darius Moradpour. Amyloïdose héréditaire à transthyréline. *Rev Med Suisse* 2016; volume 12. 1434-1440
- [53] Cohen AH. Collagen Type III Glomerulopathies. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2012 ;19(2):101-106. doi:10.1053/j.ackd.2012.02.017
- [54] Mandal SN, Shrivastava S, Piras R, Gowrishankar S. Fibronectin glomerulopathy - A sporadic case with unusual clinical manifestation. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2017 ;28:1416-20

- [55] Dan Konga, Di Wub, Tianzhen Wang, Tianzhu Li ,et all. Detection of viral antigens in renal tissue of glomerulonephritis patients without serological evidence of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. international Society for Infectious Diseases. 2013 Published by Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.01.017>
- [56] Liberopoulos E, Siamopoulos K, Elisaf M. Apolipoprotein E and renal disease. Am J Kidney Dis. 2004; volume43 issue(2) Pages:223-233. doi:10.1053/j.ajkd.2003.10.013
- [57] Collan Y, Hirsimäki P, Aho H, et al. Value of electron microscopy in kidney biopsy diagnosis. Ultrastruct Pathol. 2005 ;volume 29 issue (6) Pages:461-468. doi:10.1080/01913120500323381
- [58] Shore, J.Moss. Electron microscopy in diagnostic renal pathology. livre : Current Diagnostic Pathology Volume 8, Issue 4, August 2002, Pages 207-215
- [59] <https://abdominalkey.com/alport-syndrome-familial-benign-hematuria-nail-patella-syndrome-type-iii-collagen-glomerulopathy-and-pierson-syndrome/>
- [60] Colombat M, Holifanjaniaina S, Onifarasoaniaina S, et al. La protéomique, une nouvelle technique pour un typage optimal des amyloses [Proteomics, a new tool for an accurate typing of amyloidosis]. Rev Med Interne. 2015; volume36 issue(5): Pages 346-351. doi:10.1016/j.revmed.2014.11.006

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

قسم أبقراط

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- أنا أكرس حياتي لخدمة الإنسانية .
- وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجهد الذي يستحقونه .
- وأن أمارس مهنتي بواجب من ضميري وشرعي في جاعلا صحة مريض هدي في الأول .
- وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي .
- وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب .
- وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي .
- وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي .
- وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها .
- وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد .
- بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسما بالله .

والله على ما أقول شهيد .



المملكة المغربية
جامعة محمد الخامس بالرباط
كلية الطب والصيدلة
الرباط



جامعة محمد الخامس بالرباط
Université Mohammed V de Rabat

أطروحة رقم: 304

سنة : 2020

خزعة الكلي: تقنيات التشريح الدقيق (دراسة الأنسجة التقليدية والتقنيات الخاصة)

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : / / 2020

من طرفه

السيدة مريم الزيواني

المردادة في 27 شتنبر 1990 بالعرائش

لنيل شهادة

دكتور في الطب

الكلمات الأساسية : خزعة الكلي؛ التآلق المناعي؛ الفحص المجهرى البصري؛ المجهر الإلكتروني؛ البروتينات.

أعضاء لجنة التحكيم:

رئيس	السيدة نادية الشراي
مشرف	أستاذة في علم التشريح الدقيق السيدة لمياء الرواس
عضو	أستاذة في علم التشريح الدقيق السيد طارق بوعطار
عضو	أستاذ مبرز في أمراض الكلي السيدة كوثر الزناتي
عضو	أستاذة في علم التشريح الدقيق السيدة بسمة الخنوسي
	أستاذة في علم التشريح الدقيق