

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ANNEXES

Introduction.....1

Etude bibliographique.....3

Chapitre I : Cancer gastrique

I.1-Définition4

I.2-Aperçu sur l'anatomie de l'estomac.....4

I.2.1- Structure4

I.2.2- Régions de l'estomac.....5

I.2.3-Couches de paroi de l'estomac.....6

II.3- épidémiologie du cancer gastrique.....6

II.3.1-Distribution Géographique mondiale du cance gastrique.....6

II.3.2-Sexe et âge.....7

II.3.3-Facteurs de risque.....7

Chapitre II : le virus d'Epstein-Barr

II.1-Découverte8

II.2-Structure8

II.3-Génome9

II.4-cellules cibles infectées par l'EBV.....10

II.4.1-cellules épithéliales11

II.4.1.1-étape d'attachement.....11

II.4.1.2-étape de fusion.....12

<u>II.5- Protéines exprimées pendant le cycle virale</u>	13
<u>II.5.1- les protéines de latence d'EBV</u>	13
<u>II.5.2-les ARN non codants et les micro ARN</u>	15
<u>II.5.3-les protéines du cycle lytique d'EBV</u>	15
<u>II.5.3.1- les protéines très précoces</u>	15
<u>II.5.3.2-les protéines précoces</u>	16
<u>II.5.3.3- Les protéines tardives</u>	16
<u>Chapitre III : virus Epstein-Barr associé au cancer gastrique</u>	
<u>III .1-Incidence</u>	16
<u>III.2-distribution géographique</u>	16
<u>III.3-Sexe et âge</u>	17
<u>III.4-Facteurs de risque</u>	17
<u>III.5-Localisation de tumeurs causées par EBV</u>	18
Matériel et méthodes.....	19
<u>I- Eude histologique</u>	20
<u>I.1- Fixation</u>	20
<u>I.2- Inclusion</u>	20
<u>I.3- Microtomie</u>	20
<u>I.4- coloration</u>	21
<u>I.4.1- Principe</u>	21
<u>I.5- Montage</u>	21
<u>II- L'immunohistochimie</u>	22
<u>II.1-Principe</u>	22
<u>II.2-Marqueur utilisé</u>	23
<u>II.3-Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle LMP-1</u>	23

<u>Résultats et discussions</u>	24
• <u>Premier essai</u>	26
• <u>Deuxième essai</u>	27
• <u>Troisième essai</u>	28
Conclusion	29

Annexe 1 : Protocole de la coloration HES

Annexe 2 : Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle.

Liste des abréviations

CG	<i>Cancer gastrique</i>
EBV	<i>Virus Epstein-Barr</i>
TCGA	<i>The Cancer Génome Atlas</i>
MSI	<i>Instabilité des microsatellites</i>
CIN	<i>Instabilité Génomique</i>
CS	<i>Génomiquement stable</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylnositol -4,5- Biphosphate 3 kinase catalytic subit alpha</i>
JAK2	<i>The Janus kinase 2</i>
PD-L1	<i>Programmed ligand 1</i>
IL	<i>Interleukine</i>
EBVaCG	<i>Virus Epstein-barr associé au cancer gastrique</i>
Kpb	<i>Kilo paire de base</i>
TR	<i>Terminal Repeat</i>
IR	<i>Internal repeat</i>
US	<i>Short unique région</i>
UL	<i>Long unique région</i>
ADN	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
OriP	<i>Origine de répliation</i>
OriLyt	<i>Origine de répliation lytique</i>
DL	<i>Duplicated sequence Right</i>
DR	<i>Duplicated sequence left</i>
CD21	<i>Cluster de différenciation21</i>
HLA	<i>Complexe majeur d'histocompatibilité humain</i>
Gp	<i>Glycoprotéine</i>
EBNAs	<i>Epstein-barr nuclear antigen</i>
LMPs	<i>Latent membran protein</i>
ARN	<i>Acide Ribonucléique</i>
EBERs	<i>epstein-barr encoded small RNAs</i>

Nt	<i>Terminaison amine</i>
Ct	<i>Domaine Carboxy terminal</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
MAP kinase	<i>Mitogen activated protein</i>
PI3K	<i>La phosphoinositide 3-kinase</i>
Tyr	<i>Tyrosine</i>
EDTA	<i>Éthylènediaminetétraacétique</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
AC	<i>Anticorps</i>
DAB	<i>3-3' Diaminobenzididine</i>
IHC	<i>Immunohistochimie</i>
FISH	<i>HybridationFluorescente In Situ</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
HES	<i>Hématoxylin éosine safran</i>

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Schéma général du tube digestif.....	4
<u>Figure 2</u> : Schéma des régions et les couches de la paroi de l'estomac.....	5
<u>Figure 3</u> : Couches de la paroi de l'estomac.....	6
<u>Figure 4</u> : Carcinogénèse gastrique e.....	7
<u>Figure 5</u> : Schéma de la structure d'EBV.....	8
<u>Figure 6</u> : Représentation schématique de génome EBV.....	10
<u>Figure 7</u> : Représentation schématique des glycoprotéines de l'EBV et de leurs interactions.....	11
<u>Figure 8</u> : Mécanismes d'infection des cellules épithéliales par EBV.....	12
<u>Figure 9</u> : Répartition mondiale du cancer gastrique associé à l'EBV.....	17
<u>Figure 10</u> : Localisation du cancer gastrique à EBV par site dans l'estomac...	18
<u>Figure 11</u> : Coloration Hématoxyline éosine-safran.....	21
<u>Figure 12</u> : Méthode immunohistochimique enzymatique.....	22
<u>Figure 13</u> : Marquage aspécifique Nucléaire (Grossissement x100).....	26
<u>Figure 14</u> : Marquage membranaire et nucléaire (Gx100).....	27
<u>Figure 15</u> : Marquage membranaire et cytoplasmique(Gx100).....	28

Liste des Tableaux

<i><u>Tableau 1</u> : Nomenclature des protéines de latence.....</i>	<i>13</i>
<i><u>Tableau 2</u>: Anticorps primaire utilisé en immunohistochimie.....</i>	<i>23</i>
<i><u>Tableau 3</u> : Tableau de comparaison entre deux fixateurs Formol et liquide de Bouin.....</i>	<i>25</i>

Rapport-Gratuit.com

LIEU DE STAGE

Mon stage de deux mois s'est déroulé au sein du laboratoire de recherche de biologie moléculaire situé à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès sous la direction de Mme. LE PROFESSEUR BENNIS SANAË.



Introduction

A l'échelle mondiale, le cancer gastrique demeure un problème de santé publique majeur, constituant la 3ème cause de mortalité par cancer avec un pronostic qui est péjoratif (1). Il occupe la deuxième place parmi les cancers digestifs après les cancers colorectaux (2-3). Son incidence varie selon les régions géographiques mais est globalement en régression(1). Plusieurs travaux ont été réalisés pour identifier les différents facteurs de risque du cancer gastrique en montrant que c'est un cancer multifactoriel (4)

En 2014, une étude réalisée dans le cadre du projet the Cancer Génome Atlas {TCGA } a permis de classer les adénocarcinomes gastriques en 4 sous types moléculaires différents: MSI (l'instabilité des microsatellites), EBV(virus Epstein-Barr) ; CIN(instabilité génomique) et un sous type génomiquement stable (GS)

Dans le sous-type tumoral EBV, de fréquentes mutations de phosphatidylinositol -4,5- Biphosphate 3 kinase catalytic subsit alpha (PIK3CA) étaient mises en évidence, ainsi que des amplifications de januse kinase 2 (JAK2) et des sur-expressions du programmed death ligand 1 (PD-L1 ainsi qu'une hyperméthylation extrême d'ADN Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence d'importantes voies médiées par l'interleukine 12, suggérant une présence notable de cellules immunitaires (5)

L'EBV, malgré son importance dans la carcinogénèse a longtemps été sous-estimé, mais avec l'accumulation de séries de cas de carcinome gastrique associé à l'EBV le développement d'analyses moléculaires complètes a fourni la preuve que le CG à EBV est un sous-ensemble distinct, tant du point de vue clinique que du point de vue moléculaire

Mon projet de fin d'études s'inscrit dans ce cadre et va porter sur la mise au point du test EBV, en tant que biomarqueur moléculaire dans le cancer gastrique par la technique d'immunohistochimie

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- cancer gastrique :

I.1-Définition :

Le cancer de l'estomac, appelé cancer gastrique, est un type de cancer dû à la multiplication anarchique d'une cellule pariétale normale pour former une masse appelée tumeur maligne. Cette tumeur se développe à partir de la muqueuse gastrique (revêtement interne du paroi gastrique) ou la sous muqueuse. 90 % des cancers de l'estomac sont des adénocarcinomes. .

I.2-Aperçu sur l'anatomie d'estomac :

I.1.1-Structure :

L'estomac est la portion du tube digestif en forme de poche, situé entre l'œsophage et le duodénum. Chez l'être humain, l'organe est en forme de J majuscule, à l'âge adulte il fait 20 à 25 cm de haut, et peut contenir jusqu'à 4 litres. L'estomac est en rapport anatomique avec le foie (à droite), la rate (à gauche), le pancréas (en arrière), le diaphragme (en haut) et les intestins (en bas) (Figure 1).

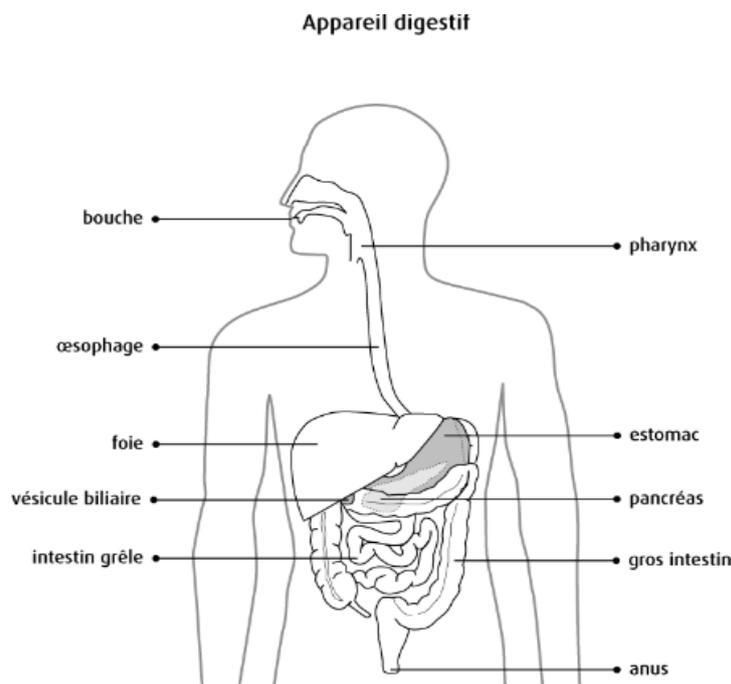


Figure 1 : schéma général du tube digestif

I.1.2-Régions de l'estomac :

L'estomac est divisé en 5 régions : (figure 2)

- **Le cardia** est la région initiale de l'estomac. Il est situé sous l'œsophage avec lequel il communique.
- **Le fundus** est une région arrondie située à gauche du cardia et au-dessous du diaphragme.
- **Le corps** est la partie principale de l'estomac et la plus grande, où les aliments commencent à se désintégrer.
- **L'antre** est la partie inférieure de l'estomac. L'antre entrepose les aliments décomposés jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être évacués dans l'intestin grêle.
- **Le pylore** est la partie de l'estomac qui communique avec l'intestin grêle. Cette région comprend le sphincter pylorique,
- **Le sphincter pylorique** empêche aussi le contenu du duodénum de remonter dans l'estomac. [6,7,8]

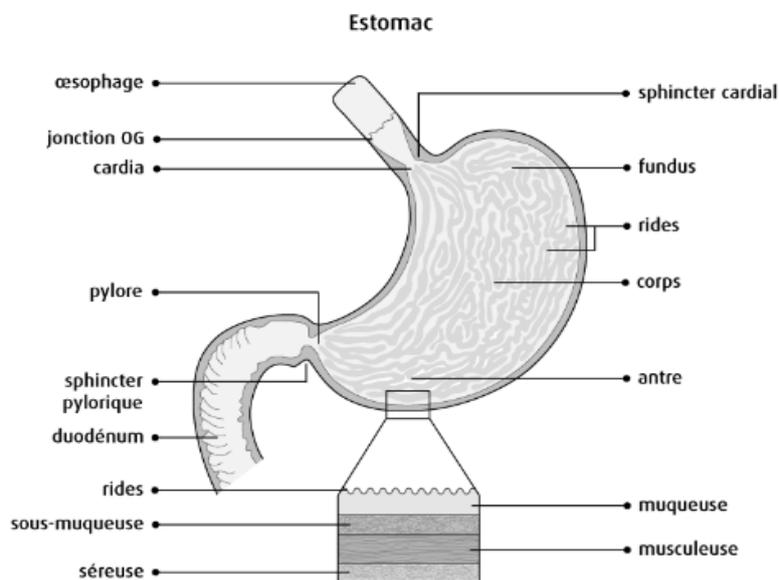


Figure 2 : schéma des régions et des couches de la paroi de l'estomac

I.1.3-Couches de la paroi d'estomac :

L'estomac est constitué de plusieurs couches de tissu (Figure 3).

- **La muqueuse** (membrane muqueuse) est le revêtement interne de l'estomac.
- **la sous-muqueuse**. Elle est composée de tissu conjonctif qui comprend de gros vaisseaux sanguins et lymphatiques, des cellules nerveuses et des fibres.
- **La musculuse** : C'est le muscle principal de l'estomac.
- **La séreuse** est la membrane fibreuse qui recouvre l'extérieur de l'estomac. [8,9]

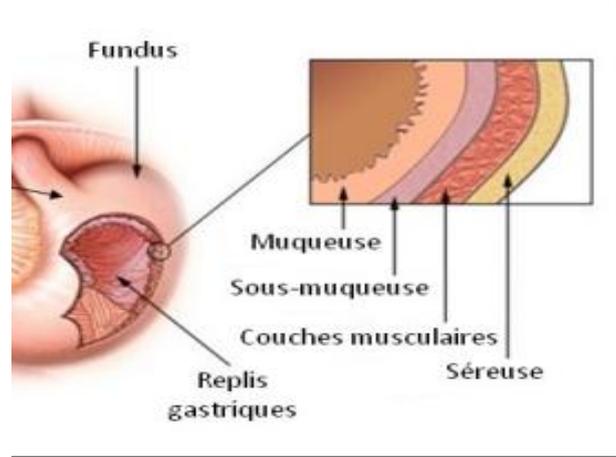


Figure 3 : couches de la paroi de l'estomac

I.3- Epidémiologie du cancer gastrique :

I.3.1-Distribution géographique mondiale du cancer gastrique :

Selon l'estimation mondiale de l'international [agency for research on cancer 2002], le cancer de l'estomac occupe le 4ème rang des cancers, et la 2ème cause de mortalité par cancer (10%) [9] ;

Son incidence en 2002 est estimée à 0,9 millions de nouveaux cas dans le monde [10], cependant cette incidence est variable d'un pays à l'autre. Il existe des zones à forte incidence comme le Japon (128cas /100.000hab/an) où le cancer gastrique représente le 1er cancer[11] et 20% de tous les cancers [9]; suivi de la Chine, la Corée, le Pérou, l'Amérique du sud et l'Europe de l'est [9]. Les zones à faible incidence <10 cas / 100 000habitants se trouvent au

Maghreb où le cancer de l'estomac représente 5,2% de tous les cancers. En Algérie, il se situe dans la 6ème place et occupe la 2ème position des cancers digestifs après le cancer colorectal [12].

Au Maroc, l'incidence du cancer de l'estomac reste plus faible que celle des pays développés et se rapproche de celle des pays du Maghreb [12]. Une étude réalisée à Casablanca place le cancer gastrique en 4ème rang soit 3,1% de tous les cancers et 33% des cancers du tube digestif [13].

II. 3.2-Sexe et âge :

Les cancers de l'estomac surviennent rarement avant l'âge de 40 ans. L'incidence augmente rapidement au-delà, ainsi, environ 60% des patients atteints de ce cancer ont plus de 65 ans avec une prédominance masculine [14].

II.3.3-Facteurs de risque :

Les principaux facteurs de risque reconnus du cancer de l'estomac sont : une gastrite chronique causée par une bactérie appelée « *Helicobacter pylori* », le tabagisme, une alimentation riche en produits salés et pauvre en légumes et en fruits frais. Des antécédents de cancer de l'estomac dans la famille ou encore une prédisposition génétique augmentant le risque de développer un cancer de l'estomac (Figure 4).

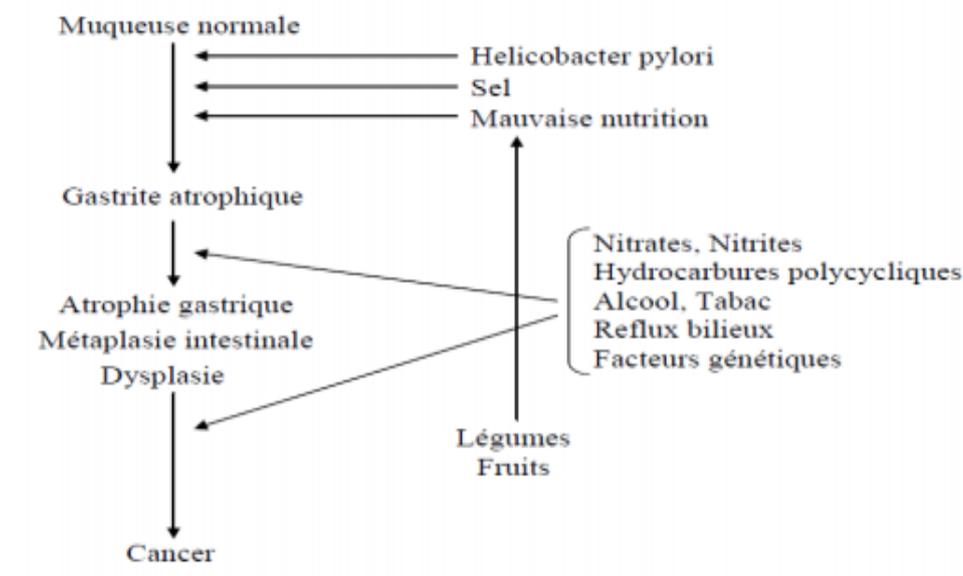


Figure 4: carcinogénèse gastrique

II-Aperçu sur le Virus Epstein-Barr :

II.1- Découverte

Le virus Epstein Barr est un herpesviridae à fort potentiel oncogène, sa découverte en 1964 fut l'aboutissement de plusieurs années de recherches menées par les virologues Anthony Epstein et Yvonne Barr en collaboration avec le chirurgien Denis Burkitt.[15]

II.2-Structure

EBV possède une structure (figure 5) protégée par une capsidie icosaédrique contenant un génome viral codant pour environ 85 protéines. Un tégument composé de protéines virales est situé entre la capsidie et la bicouche lipidique dans laquelle ce sont enchâssées des glycoprotéines [16]

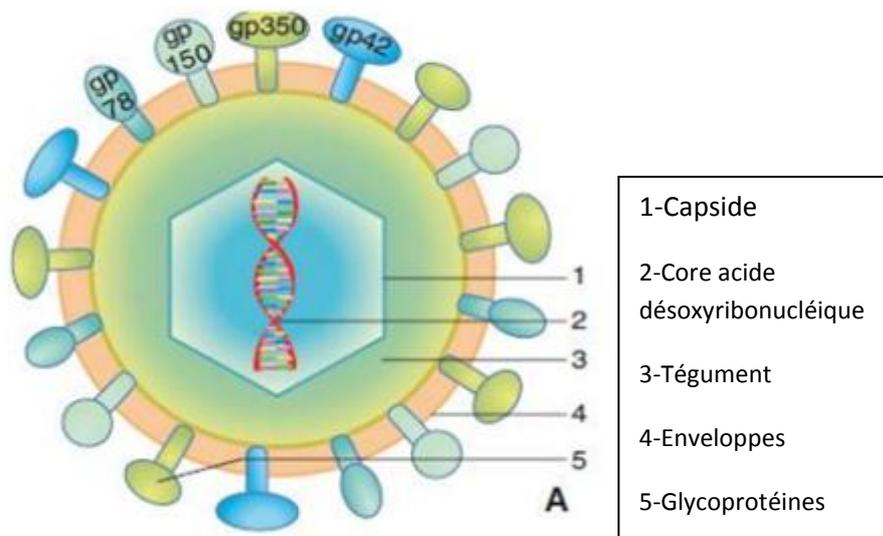


Figure 5 : schéma de la structure d'EBV

II.3-Génome :

Le génome de l'EBV (figure 6) est composé de 172 kilo paires de bases (kpb) et codent pour 86 protéines (souche B95-8). Il est composé de 2 domaines uniques :

- Un domaine court de 15 000 paires de base (pb)
- Un domaine long de 50 000 pb.

Ces 2 domaines sont séparés par des séquences répétées en tandem de 3071 pb.

Dans la cellule, le virus est persistant sous forme d'épisome étroitement lié à la chromatine, Dans la particule virale en revanche, l'ADN est sous forme linéaire et possède à ses 2 extrémités des séquences répétitives terminales (TR, terminal region), Ce sont ces TR qui fusionnent pour permettre le passage de la forme linéaire à la forme épisomale. Ce génome contient également 2 origines de réplication distinctes, selon qu'il se réplique durant la phase de latence ou selon qu'il effectue un cycle lytique complet. L'origine de réplication ori-Lyt est composée de 2 régions homologues DR (duplicated sequence right) et DL (duplicated sequence left). Elle permet la réplication virale et la lyse cellulaire pendant la phase lytique de l'infection L'ori-P permet la synchronisation entre la réplication virale et cellulaire (relation étroite virus - cellule hôte) permettant le maintien du génome sous forme épisomale pendant la phase de latence.[17]

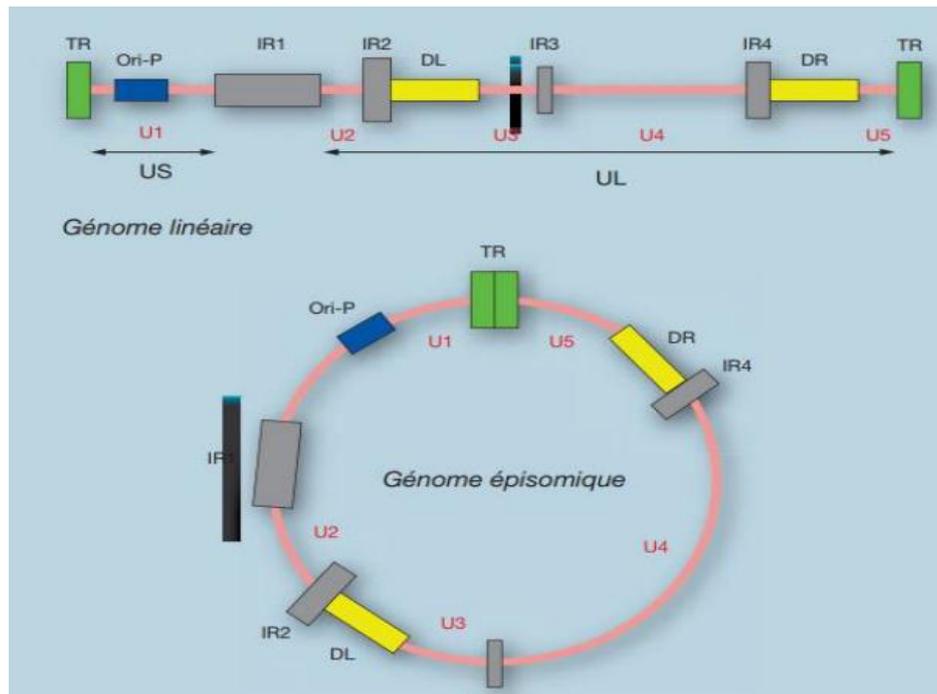


Figure 6 : Représentation schématique du génome EBV

II.4-Cellules cibles infectées par l'EBV :

Le réservoir du virus d'Epstein-Barr est strictement humain. Le virus est transmis par la salive. [18]

Les maladies auxquels l'EBV est associé reflètent un tropisme prédominant d'EBV pour deux types cellulaires : **les lymphocytes B et les cellules épithéliales.** (figure 7)

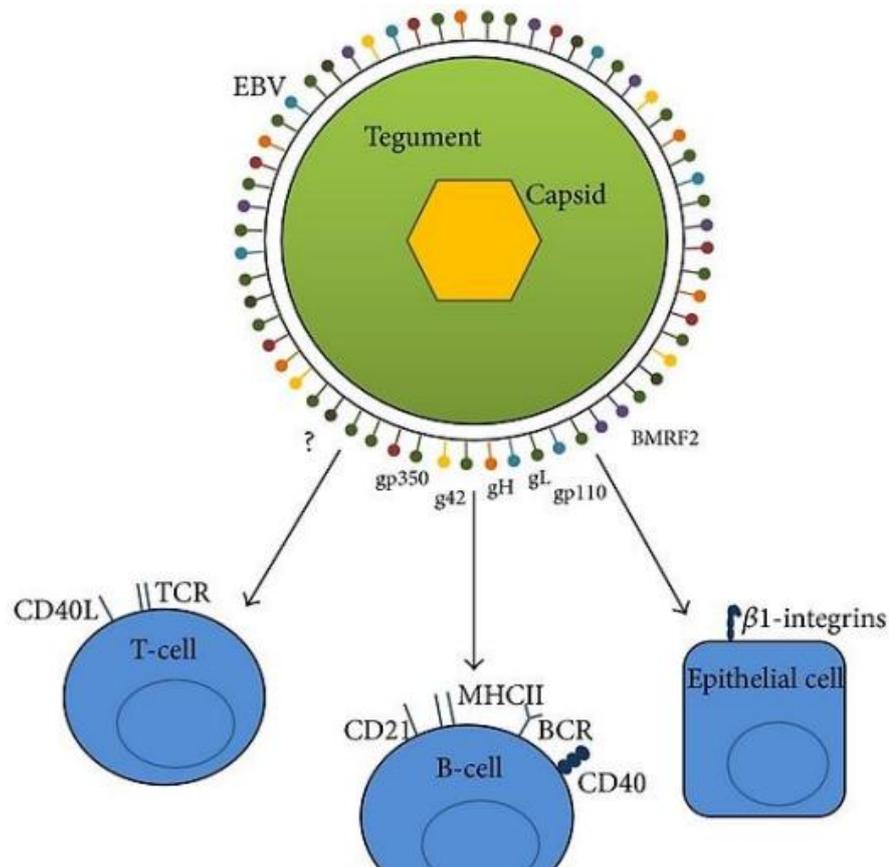


Figure7 : Représentation schématique des glycoprotéines de l'EBV et de leurs interactions ("Epstein Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases" 2016)

Quel que soit le type cellulaire infecté par l'EBV, son mode d'action se décompose en deux étapes distinctes :

- L'attachement à la cellule cible
- Fusion membranaire qui permet l'introduction du virus, cette dernière étape n'est pas la même en fonction de type cellulaire visé.

II.4.1-Cellules épithéliales :

La pénétration de l'EBV dans les cellules épithéliales met en jeu un mécanisme plus complexe, qui n'est pas encore totalement connu.

II.4.1.1-L'étape d'attachement :

Les cellules épithéliales n'expriment que très faiblement le CD21 (cluster de différenciation 21) in vitro alors qu'il est complètement absent in vivo. De plus, le taux d'expression de molécules du complexe d'histocompatibilité humain (HLA) de classe II est très faible, rendant la présence de glycoprotéine 42 (gp42) inutile à

Rapport-gratuit.com



la pénétration du virus et aussi elle provoque l'inhibition de la fixation et de la fusion [19,20].

Le virus utilise différentes intégrines pour l'attachement. Le dimère gH-gL peut permettre l'attachement direct aux intégrines $\alpha 5\beta 6$ et $\alpha 5\beta 8$ (précédemment annoté gH-gLR) présentes à la surface des cellules épithéliales. La glycoprotéine de surface (Réponse 2 du facteur de maturation des cellules B) BMRF2 permet l'interaction avec les intégrines $\beta 1$ ou $\alpha 5\beta 1$ [20] et l'attachement du virus à la cellule épithéliale.

II.4.1.2-l'étape de fusion :

L'interaction entre gHgL et le récepteur gH-gLR induit un changement de conformation du dimère gH-gL, permettant l'interaction de gB avec la membrane plasmique et l'initiation de la fusion [21] (figure 8)

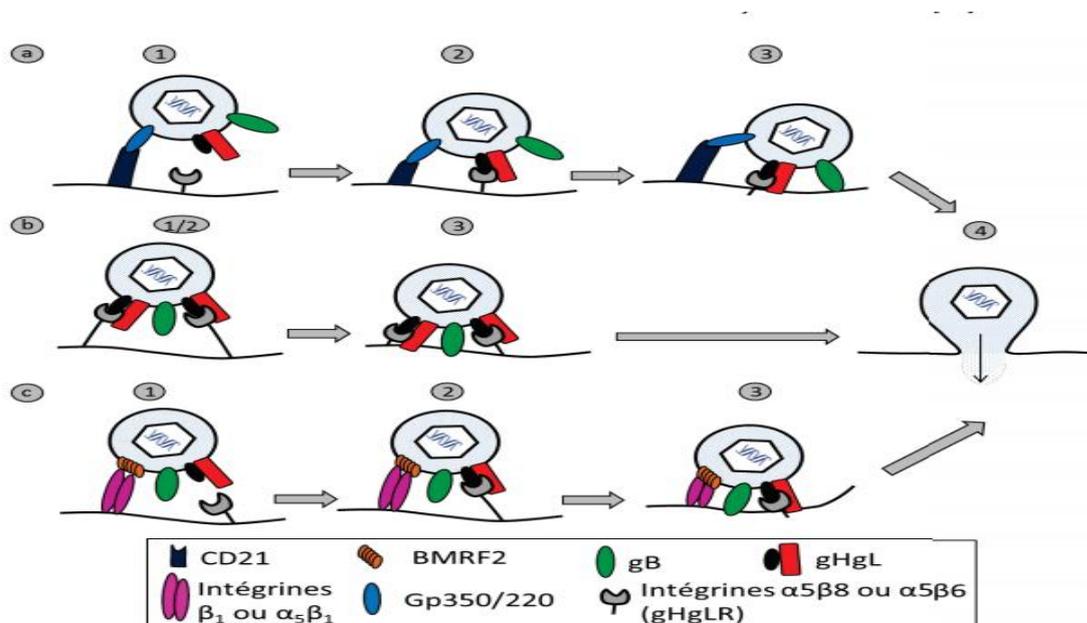


Figure 8: Mécanisme d'infection des cellules épithéliales par EBV. L'attachement du virus aux cellules épithéliales dépend des récepteurs cellulaires de surface. Les détails des mécanismes sont donnés dans le texte. Adapté de Hutt-Fletcher (2007).

- **Remarque :** EBV est capable de se propager entre cellules épithéliales adjacentes en traversant les membranes latérales au niveau des jonctions serrées. Il est fréquemment associé à des pathologies cancéreuses. Le rôle du virus dans le déclenchement et l'extension de ces tumeurs reste mal connu, cependant son

existence à l'état clonal dans la plupart des cellules cancéreuses laisse penser que sa présence est loin d'être fortuite.

II.5-les protéines exprimées pendant le cycle viral :

Comme tous les herpesviridae, le virus EBV peut exister sous 2 formes : une forme de latence qui assure sa persistance et une forme lytique qui permet sa réplication.

II.5.1-Les protéines de latence d'EBV

L'EBV établit une infection latente dans les cellules épithéliales qu'il infecte, par l'expression d'un nombre restreint de protéines virales. Ces protéines virales associées à la latence, ainsi que leurs fonctions actuellement connues sont répertoriées dans le tableau (1). Elles comprennent 6 protéines nucléaires (EBNAs) et 3 protéines membranaires (LMPs), en plus de deux gènes qui sont transcrits en grandes quantités EBERs (epstein-barr encoded small RNAs) mais non traduits en protéines. L'analyse des gènes mutés ou délétés a prouvé que ces protéines sont indispensables à la transformation cellulaire ou (immortalisation)

Tableau 1 : Nomenclature des protéines de latence

Protéines virales	latence	Localisation	Fonctions principales
EBNA-1	L,II, III	Nucléaire	requis pour la réplication épisomale et la maintenance du génome viral
EBNA-2	III	Nucléaire	stimule ainsi la transcription de certains gènes viraux tels que ceux codant LMP-1 et LMP-2. Elle est également

			responsable de la surexpression de certains gènes cellulaires comme le gène codant la protéine membranaire CD21 (récepteur d'EBV)
EBNA3-A/B/C	III	Nucléaire	sont des régulateurs de la transcription
EBNA-LP	III	Nucléaire	ensemble de protéines extrêmement polymorphiques. Cependant la fonction de EBNA-LP demeure floue, elle pourrait jouer un rôle dans le traitement de l'ARN ou être associée avec certaines protéines de régulation nucléaire
LMP-1	II,III	Membranaire	induit de nombreuses voies de signalisation comme la voie nuclear

			factor-kappa (NF-kB) , la voie des Mitogen-activated protein kinases (MAP kinases) pour la prolifération cellulaire et la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pour la survie et motilité cellulaire
--	--	--	--

II.5.2-Les ARN non codants et micro-ARN :

Les EBER sont des petits ARN non polyadénylés, retrouvés de façon très abondante dans les cellules infectées par l'EBV. Depuis quelques années, les micro-ARN d'EBV font l'objet de nombreux travaux. Leur rôle dans la pathogenèse liée à l'EBV reste à élucider mais plusieurs études montrent que ces micro-ARN permettent de réguler l'expression des protéines de latence LMP-1 et LMP-2.[22]

II.5.3: les protéines de forme lytique d'EBV :

Il existe un grand nombre des protéines exprimées lors du cycle lytique (supérieur à 80), les principales protéines impliquées sont classées en trois groupes :

- Les protéines très précoces ou immédiates « Immediate early IE »
- Les protéines précoces « Early Antigens EA »
- Les protéines tardives « Late Antigens LA »

II.5.3.1-les protéines très précoces ou immédiates :

Ce groupe de protéines est particulier car certaines protéines bien caractérisées comme Zebra qui est une protéine indispensable pour la réplication d'ADN viral pendant le cycle[23], Rta peut rompre la latence virale dans les cellules épithéliales [24], et BALF1 protéine qui peut induire l'inhibition de l'apoptose [25]

II.5.3.2 :Les protéines précoces :

La protéine EB2,cette dernière permet au virus d'échapper à l'effet de la protéine kinase R (PKR),qui est une protéine intracellulaire sensible au stress cellulaire [26],BARF1 protège le virus des macrophages et les monocytes et bloque leur prolifération déclenchée par les cytokines[27]On peut citer une multitude d'autres protéines dont la protéine de liaison à l'ADN (BALF2), l'ADN polymérase (BALF5), le complexe hélicase-primase (BBLF4/BSLF1), l'exonucléase alcaline (BGLF5) ou encore l'uracyl ADN glycosylase (BKRF3)

II.5.3.3-Protéines Tardives :

Les protéines tardives sont généralement des protéines de structure Notamment les antigènes de la membrane. Nous avons cité précédemment la protéine majeure gp350/220 permettant la fixation des LB. Nous avons aussi parlé de nombreuses autres glycoprotéines comme gp110 (gB) gp85(gH) ,gp42 qui permettent l'interaction avec les différents acteurs de l'infection EBV cas des cellules épithéliale [28]

III-Virus d'epstein-barr associé à cancer gastrique :

III.1-incidence

La fréquence du cancer gastrique à EBV varie de 1,3% à 30,9% dans différentes régions, avec une moyenne de 10% dans le monde. Le CG à EBV est une maladie non endémique répandue dans le monde entier [29,30]

Sur la base de l'incidence annuelle du carcinome gastrique (934 000 cas par an), on estime que près de 70 000 à 80 000 personnes par an développeront un CG à EBV [31]

III.2-Distribution géographique :

Le carcinome gastrique positif pour le virus Epstein-Barr (EBV) est élevé dans certains pays occidentaux, comme l'Allemagne et les États-Unis, où il peut atteindre 16 à 18 %. Il est plus faible, de l'ordre de 6 à 10 %, dans la plupart des pays européens, en Amérique du Sud et en Asie, avec les taux les plus faibles en chine 4,3% [32] (figure 9).

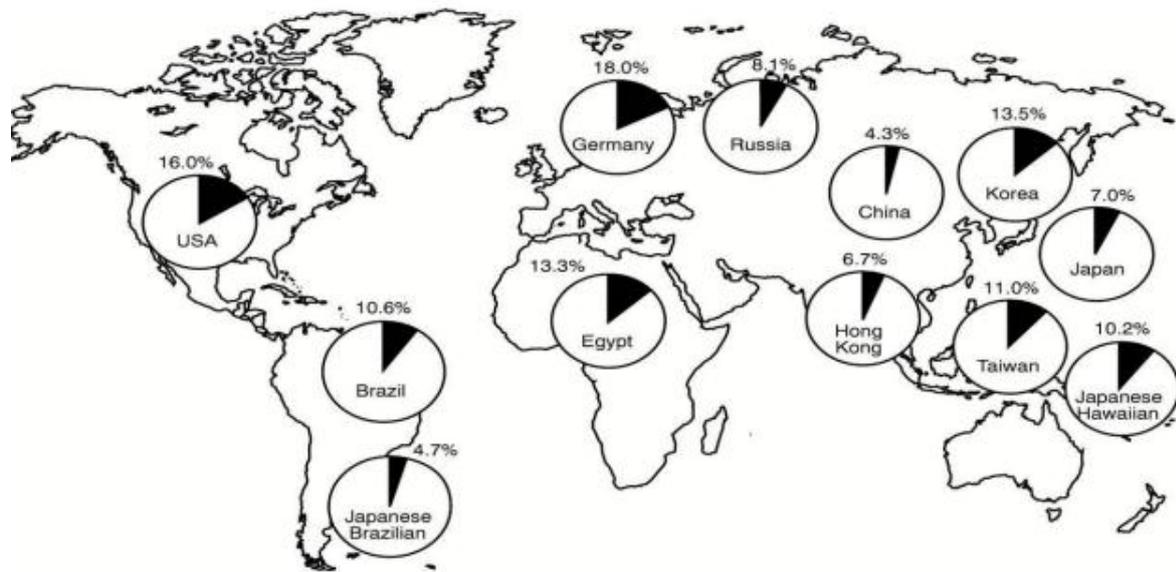


Figure 9 : répartition mondiale du cancer gastrique associé à l'EBV

III.3-Sexe et âge :

La plupart des méta-analyses ont montré une forte association entre CG à EBV et le sexe masculin (environ deux fois plus d'hommes que de femmes) [33,34,35]

III.4-Facteurs de risques :

Des preuves convaincantes permettent d'affirmer que les facteurs suivants font augmenter le risque d' EBVa CG :

- ✓ *consommation d'alimentation salée* : les aliments très salés restent plus longtemps dans l'estomac, ce qui en prolonge l'exposition. La paroi de l'estomac devient aussi plus vulnérable aux autres substances cancérigènes éventuellement présentes dans l'alimentation, comme par exemple les sels nitrés, ou encore avec la bactérie *Helicobacter Pylori*.
- ✓ *Infection a Helicobacter pylori*, Le principal facteur pouvant entrainer une infection chronique de la muqueuse gastrique.[36]

- ✓ **Les antécédents d'ulcère gastrique** augmentent le risque de GC à EBV par rapport aux GC non-EBV. C'est aussi le cas pour les Gastrites atrophiques et les restes gastriques post-chirurgicaux[37]
- ✓ **Tabagisme**, le tabac est un facteur de risque d'ulcère de l'estomac ou du duodénum. Il multiplie les risques d'infection par la bactérie *Helicobacter pylori*, et augmente la sécrétion de sucs gastriques, perturbant ainsi l'équilibre naturel du corps.[38]

III.5-Localisation des tumeurs causées par l'EBV :

Le carcinome gastrique positif pour le virus Epstein-Barr se caractérise par une localisation prédominante dans l'estomac proximal (partie supérieure de l'estomac) et le reste de l'estomac partiel pour un ulcère gastrique ou un carcinome gastrique.

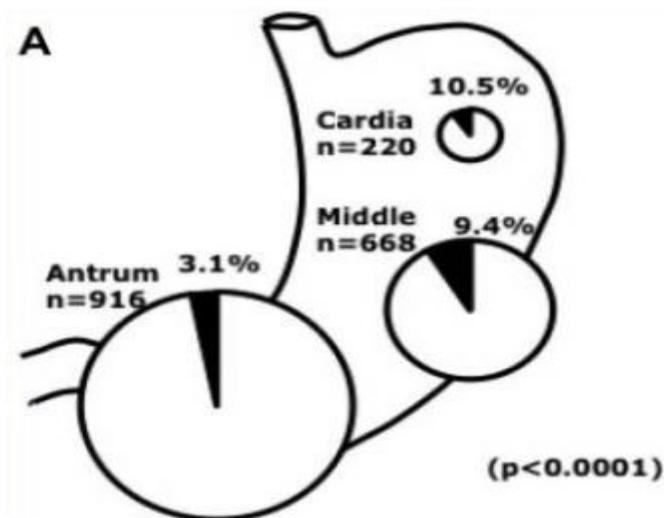


Figure 10 : localisation du cancer gastrique à EBV par site dans l'estomac

La prévalence de l'EBV est plus fréquente dans le cardia et l'estomac moyen que dans l'antrum, où plus de la moitié des cancers gastriques négatifs pour l'EBV sont localisés (figure 5) [39].

MATERIEL ET METHODES

I-Etude histologique

Dans notre série, l'ensemble des 12 échantillons répartis sous forme de 4 biopsies et 8 pièces opératoires, fixés au formol et paraffinés, ont été collectés du Service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de FES. Les prélèvements destinés au laboratoire pour un examen histologique, passent par une série d'étapes avant qu'ils ne soient lus et interprétés par le pathologiste responsable. La technique est réalisée en cinq étapes qui sont principalement :

I.1 La fixation :

La fixation a pour but de conserver les structures dans un état plus proche de l'état en vivo par son action intrinsèque (empêche l'hydrolyse et la digestion enzymatique des protéines) et extrinsèque (éviter la putréfaction des tissus par les microorganismes)

On utilise le formol 10% comme fixateur, son principe repose sur le fait qu'il réagit avec les groupements aminés des protéines.

I.2- L'inclusion :

a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltrer .
Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu à examiner, celui-ci doit être très fin.

Le milieu d'inclusion utilisé au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Hassan II-Fès est la paraffine : une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool. Comme cette substance est hydrophobe, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant son inclusion dans la paraffine

L'inclusion est précédée de deux étapes essentielles :

Il faut tout d'abord procéder à la déshydratation : les tissus sont passés dans des bains d'alcool de degré croissant (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°). L'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur.

L'alcool (éthanol) est ensuite remplacé par un solvant miscible à la paraffine : il s'agit soit de xylène, soit de toluène (hydrocarbures). Ces substances éliminent l'éthanol.

I.3-La microtomie :

Les coupes du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

I.4-Coloration

Méthode manuelle

I.4.1-Principe :

La coloration histologique permet de différencier finement tous les éléments d'un tissu. Elle consiste à accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

La coloration utilisée est de type H.E.S (hématoxyline-éosine safran). Elle a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène.

- **L'hématoxyline colore le noyau en violet**
- **l'éosine colore le cytoplasme en rose,**
- **le safran colore les fibres de collagène en jaune.**

Les lames doivent être préparées, afin de pouvoir recevoir les colorants.

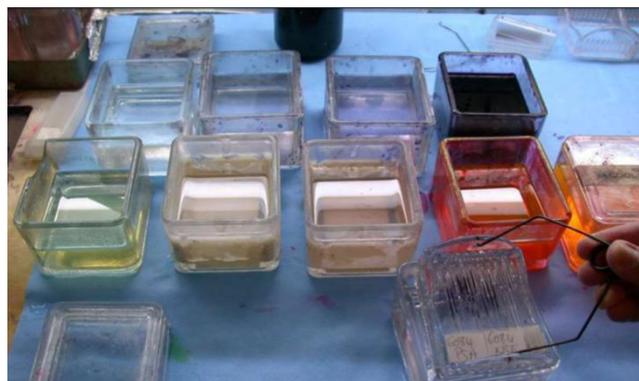


Figure11: coloration HES

Protocole de coloration HES : ANNEXE I

I.5-Montage :

Rapport-gratuit.com



Les lames sont montées pour préserver les colorations (plus difficile avec les marquages, pour lesquels on utilise généralement des photos). Les lames sont déshydratées grâce à des bains en toluène, puis des lamelles de verre sont collées par-dessus (grâce à des résines synthétiques) afin de préserver les préparations. Les lames ainsi montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années.

II-L'immunohistochimie :

II.1- Principe

Le but de l'immunohistochimie est de mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'une réaction antigène – anticorps. Le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré. Le réactif principal est un anticorps spécifiquement dirigé contre ce motif. Un traceur fixé directement ou indirectement sur l'anticorps permet de détecter la liaison entre l'anticorps et sa cible.

L'immunohistochimie permet ainsi d'analyser et de localiser, par visualisation directe, les composants cellulaires et tissulaires, et d'en déduire des fonctionnalités potentielles.

Immunohistochimie

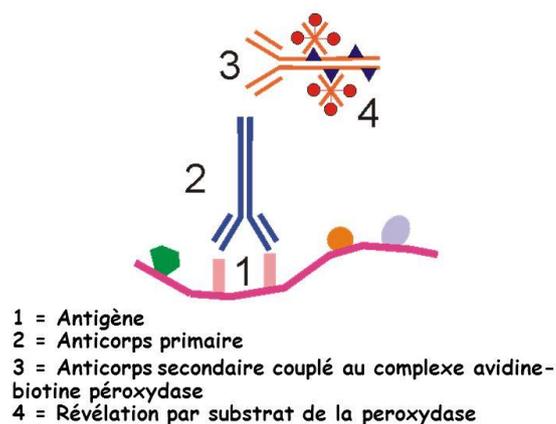


Figure 12 : méthode immunohistochimique enzymatique

II.2-Marqueur utilisé :

Tableau2 :Anticorps primaire utilisé en IHC :

ANTICORPS PRIMAIRE	FOURNISSEUR	espèce	clone	Dilution IHC	fonction
LMP-1	DAKO	Monoclonal mouse	CS.1	Sans	Protéine membranaire majeur

II.3-Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle LMP-1 :

Des coupes de tissus tumoraux sont étalées sur des lames prétraitées pour une adhésion maximale du tissu au support, pendant une nuit à 60°C. Le reste de la paraffine est éliminé par passages successifs dans des bains de toluène et d'éthanol, et réhydratées par un rinçage à l'eau courante. L'inhibition des peroxydases endogènes est obtenue après incubation des coupes histologiques avec une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,3%; puis un démasquage antigénique est réalisé par passage des lames dans une solution d'EDTA (pH=9). Après refroidissement, les coupes sont trempées dans une solution PBS (phosphate buffered saline), puis l'incubation avec la protéine bloquante et l'anticorps primaire est réalisée. Pour la révélation de la réaction immunohistochimique, l'échantillon est recouvert d'un réactif de coloration en mélangeant chromogène à la Diaminobenzididine (DAB).

Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle : (Annexe 2)

Résultats et discussion

L'étude histologique est une étape crucial pour le diagnostic, c'est grâce à cette étape que la zone tumorale est délimitée. Donc, il faut veiller à ce que les étapes pré-analytiques soient bien faites pour assurer la fiabilité de marquage :

- La fixation étant une étape essentielle, elle doit être rapide et bien faite pour éviter les problèmes de sur et sous fixation qui peuvent influencer toute la technique d'IHC, Les fixateurs les plus utilisés sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique) :

	Avantages	Inconvénients
Formol+++	Permet la fixation prolongée des tissus (quand temps dépasse 24h) Permet de nombreuses techniques complémentaires :IHC,FISH,PCR	Temps de fixation plus long (12h à 24h) Liquide incolore risque d'être confondu avec d'autres
Liquide de Bouin	fixation rapide en quelques heures est suffisante identification aisée du liquide à couleur jaune permet de techniquer rapidement la biopsie	Durcissement des tissus Empêche Quelques techniques comme certains marqueurs immuno-histochimiques. Masquage des épitopes

Le fixateur idéal c'est le formol 10%, la quantité de fixateur utilisée doit être au moins dix fois plus importante que le volume de tissu à fixer. La durée de fixation :

- Pour les pièces opératoires est de 6h à 48h
- Pour les biopsies, elle ne doit pas être inférieure à 6h, ni supérieure à 24h

- Pour l'étape d'inclusion, il faut utiliser de la paraffine neuve et éviter l'incubation prolongée dans la paraffine fondue qui peut altérer les épitopes. Il ne faut pas utiliser des lames blanches anciennes, le démasquage de l'antigène doit se faire à chaleur constante

Les lames doivent être préparées deux ou 3 jours avant la technique, si les lames sont conservées longtemps par exemple plus de 6 mois, ceci risque de diminuer l'antigénicité ce qui peut conduire à des faux négatifs comme résultats d'IHC.

Après l'étude histologique, L'immunohistochimie est réalisée. Elle consiste à mettre en évidence l'expression de certaines protéines comme biomarqueurs moléculaires. En effet, cette technique a eu un impact majeur sur le diagnostic des tumeurs du fait que de nombreux types de tumeurs expriment des molécules plus ou moins spécifiques. Les épitopes sont très souvent conservés dans le matériel tumoral inclus en paraffine, la sensibilité et la spécificité de la technique sont généralement bonnes. De nouveaux marqueurs peuvent être analysés.

- ✚ Pour la mise au point d'immunohistochimie pour l'EBV, plusieurs essais ont été faits. On s'est focalisé surtout sur les étapes de démasquage antigénique et le temps d'incubation d'anticorps primaire dirigé contre la protéine LMP-1 qui sont des étapes clés de l'IHC:

- ✓ *Le premier essai : le démasquage antigénique a été effectué avec le tampon citrate (pH=6) et avec une durée d'incubation d'une heure pour l'anticorps primaire :*

Résultat : Pas de marquage membranaire, le démasquage des épitopes avec le citrate n'a pas marché et c'est la raison pour laquelle, il y'avait un marquage nucléaire aspécifique.

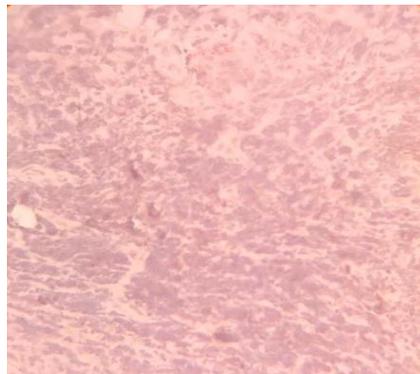


Figure 13: marquage aspécifique nucléaire du LMP-1

- ✓ *Le deuxième essai ,le démasquage a été réalisé avec l'EDTA (Ph=9) plus une durée d'incubation d'une heure pour l'anticorps primaire :*

Résultat : 90% de la lame présente un marquage membranaire mais 10% des zones présentent un marquage nucléaire. Dans cet essai, le démasquage antigénique avec l'EDTA a réussi, il y'avait une saturation presque complète des sites aspécifiques, donc une meilleure reconnaissance de l'antigène par l'anticorps correspondant.

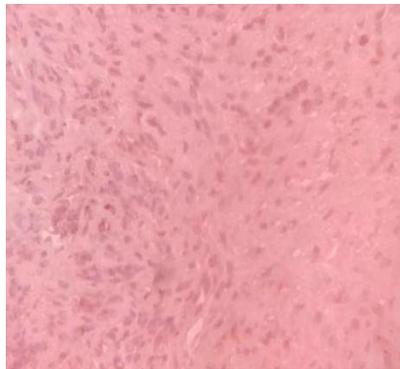


Figure 14 : Marquage membranaire et nucléaire

Le tampon citrate et l'EDTA fournissent la plus grande sensibilité du marquage associé à une grande reproductibilité. Les deux solutions sont utilisées pour le démasquage antigénique, mais différent par la valeur de pH. Pour la grande majorité des anticorps, le marquage est peu influencé par le pH, mais pour un certain nombre d'anticorps, le pH est critique. Ceci est probablement le cas pour l'anticorps LMP-1 qui est sensible à l'EDTA (pH=9) et non sensible au citrate (pH=6).

La température de démasquage a aussi un effet sur le marquage. Plus la température est élevée, plus le démasquage est rapide et efficace

- ✓ *Le troisième essai est réalisé avec l'EDTA pendant 30min, le temps de lavage avec le pBS a été augmenté et le temps d'incubation avec l'anticorps a été diminué.*

Résultat : il y'a un marquage membranaire et cytoplasmique. Comme il a été expliqué, l'EDTA a amélioré l'exposition des épitopes antigéniques sur la surface de la section de tissus et donc, elle a permis de réduire le temps d'incubation de l'anticorps primaire.

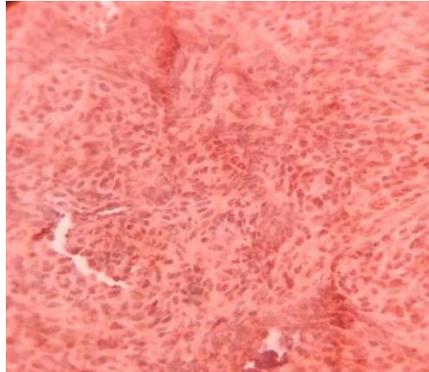


Figure 15 :marquage
membranaire et cytoplasmique

Conclusion

L'immunohistochimie a permis la mise point du test EBV par l'anticorps LMP. La révélation par cet anticorps ne présente que 30% des cas positifs, 70% des cas ne sont pas révélés et donc, il faut compléter avec la technique FISH-EBER « gold standard » qui est la détection des nombreux ARN EBERs.

Tous les cas positifs FISH (96,6%) ont exprimé EBER1 dans presque toutes les cellules de carcinome présentant un marquage nucléaire. La PCR est aussi utilisée, surtout la PCR en temps réel comme technique de choix pour détecter et quantifier le nombre de copies d'ADN de l'EBV dans tous les compartiments.

Les caractéristiques moléculaires de l'EBVa GC, telles que la surexpression programmée du ligand de la mort 1 (PD-L1), soulignent l'importance d'utilisation de l'EBV en tant que biomarqueur pour la réponse à l'immunothérapie, afin de développer un traitement ciblé.

Références

- [1]-Globocan 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
- [2] Schlansky B, Sonnenberg A. Epidemiology of Noncardia Gastric Adenocarcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol.* 106(11):1978–1985, 2011.
- [3] Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year: the global picture. *Eur J Cancer*;37(Suppl 8):S4–S66,2000
- [4] Fock KM, Talley NJ, Fass R, et al. Asia-Pacific consensus on the management of gastroesophageal reflux disease: update. *J Gastroenterol Hepatol.* ; 23(1):8–22, 2008
- [5] Yu Sunakawa, MD, PhD1 Heinz-Josef Lenz, MD Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma: Translating New Insights from The Cancer Genome Atlas Research Network, 27 March 2015
- [6]. American Cancer Society. *Stomach Cancer.* Atlanta, GA: American Cancer Society.2014
- [7].Czito BG, Palta M & Willett CG. 2013. *Stomach cancer.* Halperin EC, Wazer DE, Perez CA et al.. *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 58;2013
- [8]. Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. 2012. *Human Anatomy.*San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. National Cancer Institute. 2009. *What You Need to Know About Stomach Cancer.* Bethesda, MD: National Cancer Institute2009-2012
- [9] Inoue M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. *Postgrad.Med. J.* 2005; 81: 419-424. -Yang L., Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol*; 12(1):17-20.2006
- [10]-Yang L., Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol*; 12(1):17-20;2016
- [11]Leung WK, Ming-shiang Wu, Kakugawa Y. Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. *Lancet Oncol*; 9: 279–87 ; 2008
- [12]-Hammouda D, Bouhadeif A. Cancer de l'estomac. *Registre des tumeurs d'Alger année: 2-7 ;2004*
- [13]-Benider A, Bennani Othmani A, Katomi M, Quessar A, Sahraoui S, Sqali S. *Registre des cancers de la région grand Casablanca 2004 (Edition 2007)*
- [14] Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res*; 55: 562-565 ;1995

[15] Pujals*, Philippe Gaulard*, Joëlle Wiels « Propriétés oncogéniques du virus d'Epstein-Barr et pathologies malignes associées » Oncogenic properties of the Epstein-Barr virus and associated malignancies 2013

[16] Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Jul 19-25;310(5974):207-11* 1,984???

[17] Hammerschmidt, W., and B. Sugden.. “Identification and Characterization of oriLyt, a Lytic Origin of DNA Replication of Epstein-Barr Virus.” *Cell* 55 (3): 427–33.1988

[18] Niederman JC, Miller G, Pearson HA, Pagano JS, Dowaliby JM. Infectious mononucleosis. Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx ;294(25):1355-9, 1976 .

[19] Wang, X. and Hutt-Fletcher, L.M., Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *Journal of virology*,72(1): p. 158-63. 20,1998

[20] Wang, X., Kenyon, W.J., Li, Q., Mullberg, J., and Hutt-Fletcher, L.M., Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *Journal of virology*, . 72(7): p. 5552-8.1998

[21] Tugizov, S.M., Berline, J.W., and Palefsky, J.M., Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nature medicine*, 9(3): p. 307-14.2003

[22] wakiri D, Takada K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. *Adv Cancer Res*;107:119-36,2010

[23] Kenney, Shannon C.. “Reactivation and Lytic Replication of EBV.” 2007

[24] Szakonyi, Gerda, Michael G. Klein, Jonathan P. Hannan, Kendra A. Young, Runlin Z. Ma, Rengasamy Asokan, V. Michael Holers, and Xiaojiang S. Chen.. “Structure of the Epstein-Barr Virus Major Envelope Glycoprotein.” *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (11): 996–1001. doi:10.1038/nsmb1161 2006

[25] Juillard, Franceline, Edwige Hiriart, Nicolas Sergeant, Valérie Vingtdeux-Didier, Hervé Drobecq, Alain Sergeant, Evelyne Manet, and Henri Gruffat.. “Epstein-Barr Virus Protein EB2 Contains an N-Terminal Transferable Nuclear Export Signal That Promotes Nucleocytoplasmic Export by Directly Binding TAP/NXF1.” *Journal of Virology* 83 (24): 12759–68. doi:10.1128/JVI.01276-09,2009

[26] Sadler, A. J., and B. R. G. Williams.. “Structure and Function of the Protein Kinase R.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 316: 253–92 2007



- [27] Cohen, Jeffrey I., and Kristen Lekstrom.. “Epstein-Barr Virus BARP1 Protein Is Dispensable for B-Cell Transformation and Inhibits Alpha Interferon Secretion from Mononuclear Cells.” *Journal of Virology* 73 (9): 7627–32.1999
- [28]] Szakonyi, Gerda, Michael G. Klein, Jonathan P. Hannan, Kendra A. Young, Runlin Z. Ma, Rengasamy Asokan, V. Michael Holers, and Xiaojiang S. Chen.. “Structure of the Epstein-Barr Virus Major Envelope Glycoprotein.” *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (11): 996–1001. doi:10.1038/nsmb1161 2006
- [29] Fukayama M and Ushiku T: Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathol Res Pract.* 207:529–537. 2011. View Article : [Google Scholar](#) : [PubMed/NCBI](#) 2011
- [30] Chen JN, He D, Tang F and Shao CK: Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity. *J Clin Gastroenterol.* 46:262–271. 2012. View Article : [Google Scholar](#) 2012
- [31] Boyle P and Levin B: *Stomach Cancer.* IARC Press; Lyon 2008: View Article : [Google Scholar](#) : [PubMed/NCBI](#)2008
- [32] Camargo MC, Kim WH, Chiaravalli AM, et al: Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut.* 63:236–243. 2014
- [33]Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC and Rabkin CS: Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology.* 137:824–833. View Article : [Google Scholar](#) : [PubMed/NCBI](#),2009
- [34]] Camargo MC, Murphy G, Koriyama C, et al: Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer.* 105:38– 43.. View Article : [Google Scholar](#) : [PubMed/NCBI](#) 102,2011
- [35] Lee JH, Kim SH, Han SH, An JS, Lee ES and Kim YS: Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 24:354–365. 2009. View Article : [Google Scholar](#) : [PubMed/NCBI](#),2009
- [36] Singh S, Jha HC Status of Epstein-Barr Virus Coinfection with *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer.. [PubMed/NCBI](#) pub 21 mars 2017
- [37] Koriyama C, Akiba S, Minakami Y and Eizuru Y: Environmental factors related to Epstein-Barr virus-associated gastric cancer in Japan. *J Exp Clin Cancer Res.* 24:547–553. 2005.
- [38] Camargo MC, Koriyama C, Matsuo K, et al: Case-case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer. *Int J Cancer.* 134:948–953. 2014.

[39] Matsunou H, Konishi F, Hori H, et al: Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer*. 77:1998–2004. 1996.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

ANNEXE 1 : PROTOCOLE STANDARD DE LA COLORATION HES (Hématoxyline-éosine-safran) :

⇒ **Préparation des solutions :**

Les différents réactifs nécessaires et leurs rôles:

- Toluène pour le déparaffinage,
- Alcool (éthanol 100%, 80% et 70%) pour la fixation,
- Hématoxyline; colore les noyaux en violet,
- Eau chlorhydrique 1% (1ml Hcl+200ml H₂O distillée) ; pour enlever l'excès de l'hématoxyline,
- Solution ammoniacale (10gouttes dans 100ml de H₂O distillée) ; colore le tissu en bleu,
- Eosine 4% (4g poudre d'éosine dans 200ml de H₂O distillée) ; colore le cytoplasme en rose,
- Bain de Safran (quelque grammes dans 200ml d'éthanol à préparer la veille de la technique et chauffer à 50°C pour dissoudre le safran complètement (car il n'est soluble que dans les solvants organiques) ; pour délimiter les tissus tumorales car il colore les fibres collagènes en jaunes,
- Solution Ethanol-Méthanol : 1 volume/1 volume

Etapes	Durée
1-Déparaffinage	
Passage à l'étuve 60°C	1 nuit (ou 90°C pendant 1h)
2 bains de toluène	5min/bain
1 bain d'alcool absolu	5min
1 bain d'alcool à 80%	5min
1 bain d'alcool à 70%	5min
Rinçage à l'eau courante	1min
2-Technique	
1 bain d'hématoxyline	9min
Rinçage a l'eau courante	1min
Passage dans l'eau chlorhydrique	Un passage
Rinçage a l'eau courante	1min
Passage dans l'eau ammoniacale	Un passage
Rinçage a l'eau courante	1min
1 bain d'éosine 4%	14min
Rinçage a l'eau courante	1min
1 bain d'alcool à 70%	1min

1 bain d'alcool à 80%	1min
1 bain d'alcool absolu	1min
1 bain de Safran	15min
Ethanol-Méthanol	1min
1 bain de toluène	Lavage
Une fois la coloration est terminée, on nettoie le surplus des colorants avec du toluène et puis on fait un montage entre lame et lamelle.	

ANNEXE 2 : protocole standard de la technique d'immunohistochimie :

⇒ **Préparation des solutions:**

- 1) Tampon citrate : démasquage antigénique en inhibant les liaisons méthylènes et donc exposition des épitopes.

100ml du tampon citrate ; mélange 1,8ml d'acide critique et 8,2ml de citrate de sodium et on complète jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée

Il faut vérifier que le pH de la solution est égal à 6 (en l'ajustant avec HCl ou avec NaOH).

- 2) H₂O₂ : Inhibiteur de la peroxydase endogène.

Nous avons rempli 3/4 du bac avec de l'eau distillée et puis ajouté 3 gouttes de H₂O₂ à 30%.

- 3) Tampon Phosphate Salin (PBS) : Pour le lavage

Etapes	Durée
Déparaffinage	
Passage a l'étuve (60°C)	1 nuit
Toluène	20min
Alcool absolu	15min
Rinçage a l'eau courante	10min
Technique	
Egoutter les lames	
Passage dans H ₂ O ₂	10min
Rinçage a l'eau courante	10min
Passage au bain-marie (95°C) dans l'EDTA	30min
Rinçage a l'eau courante	Passage rapide
Rincer avec du PBS	5min
Égoutter les lames et entourer les fragments par le PAP-PEN	
Mettre le bloquant sur le fragment et disposer les lames dans une chambre humide.	15min
Enlever le surplus du bloquant en secouant	
Application de L'Ac primaire et disposer les lames dans une chambre humide.	30 min
Egoutter un peu les lames ; les mettre dans un panier	
Rinçage dabs du PBS	10min
Application de l'Ac secondaire et disposer les lames dans une chambre humide.	1h
Rinçage dans du PBS	10min
Application de la peroxydase (Pour la révélation)	15min
Rinçage dans du PBS	10min

Egoutter les lames	
Application de quelques gouttes du DAB (chromogène)	30min
Rinçage a l'eau courante	10min
Egoutter les lames	
Application de l'hématoxyline	2min
Rinçage a l'eau courante	
Montage	