



# Prélèvements tissulaires tumoraux pour analyses moléculaires : comment les gérer au mieux ?

Jean-Pierre Bellocq<sup>1,5</sup>, Caroline Egele<sup>1,5</sup>, Patricia de Crémoux<sup>3</sup>, Laetitia Ruck<sup>1,5</sup>,  
Carole Mathelin<sup>2</sup>, Elisabeth Luporsi<sup>4</sup>, Marie-Pierre Chenard<sup>1,5</sup>


SFSPM, Strasbourg, 4 novembre 2010



*<sup>1</sup>Département de Pathologie et <sup>2</sup>Département de Gynécologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, <sup>3</sup>Institut Curie, Paris, <sup>4</sup>Centre d'Investigation Clinique de Cancérologie, CHU - Centre Alexis Vautrin, Nancy, <sup>5</sup>AFAQAP (Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie Pathologique)*



## Rester efficace

- en participant à un processus technique dont l'objet est précieux
    - mettant en jeux plusieurs intervenants
    - portant sur des analyses de nature variée
  - dans un environnement économiquement contraint
- 



## Rester efficace

- en participant à un processus technique dont l'objet est précieux
  - mettant en jeux plusieurs intervenants
  - portant sur des analyses de nature variée
- dans un environnement économiquement contraint

Comment relever le défi ?



# Les points abordés

1. Les examens concernés et les modalités de conservation des tissus
2. L'échantillon et son parcours
3. Les points critiques à maîtriser
4. Les acteurs (radiologie, chirurgie, pathologie, biologie)
5. L'accréditation et la délégation de tâche
6. Focus sur uPA/PAI-1 - Où en sont les pratiques ?

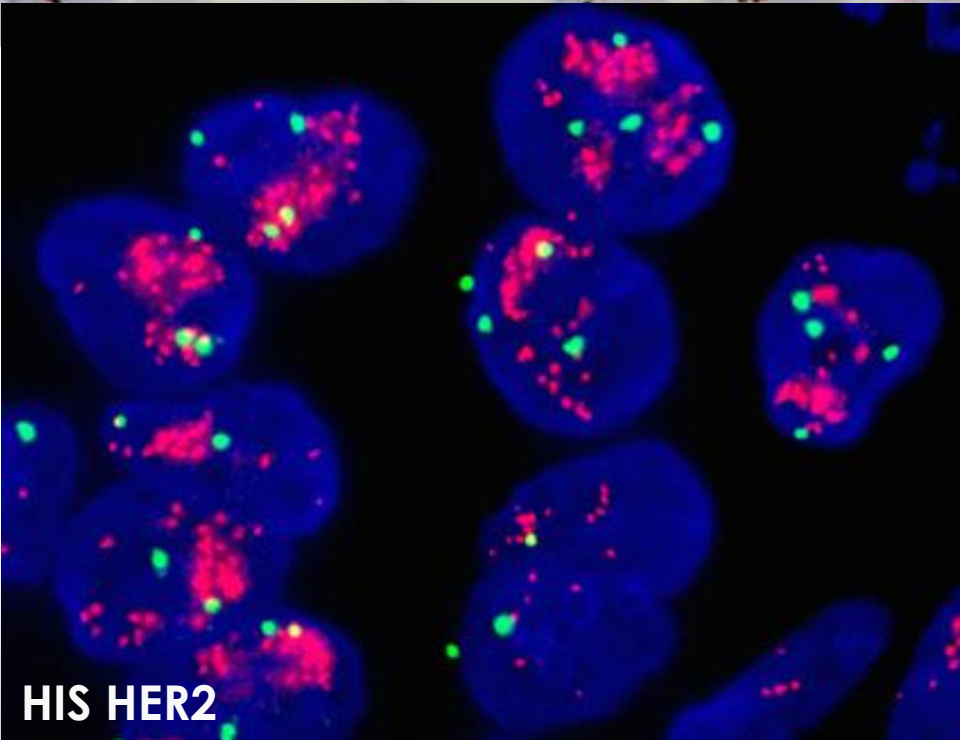
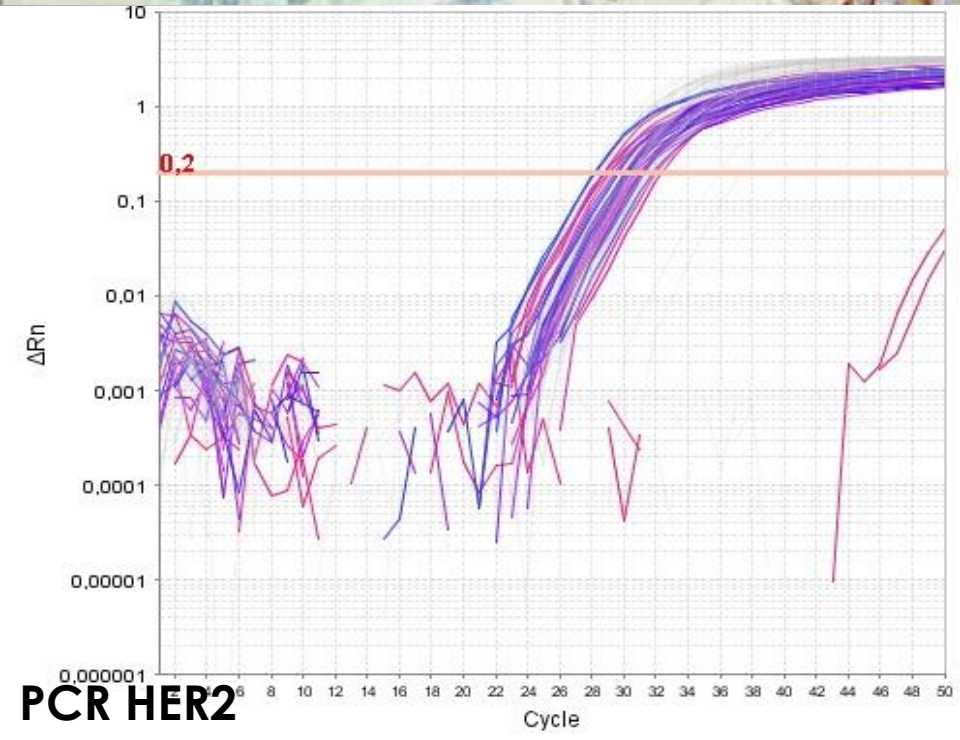
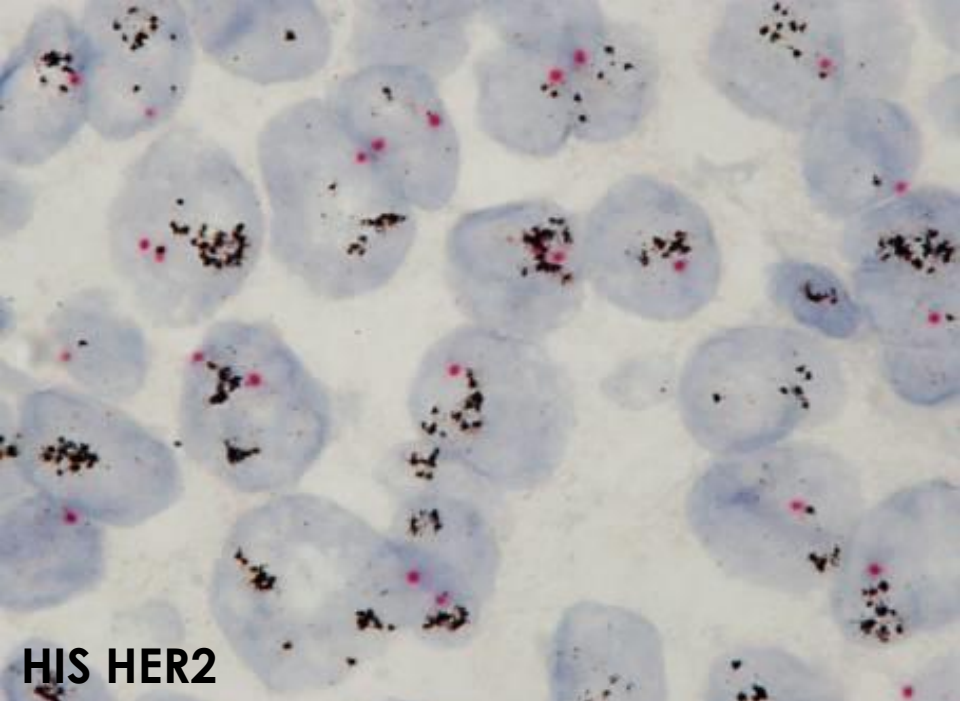
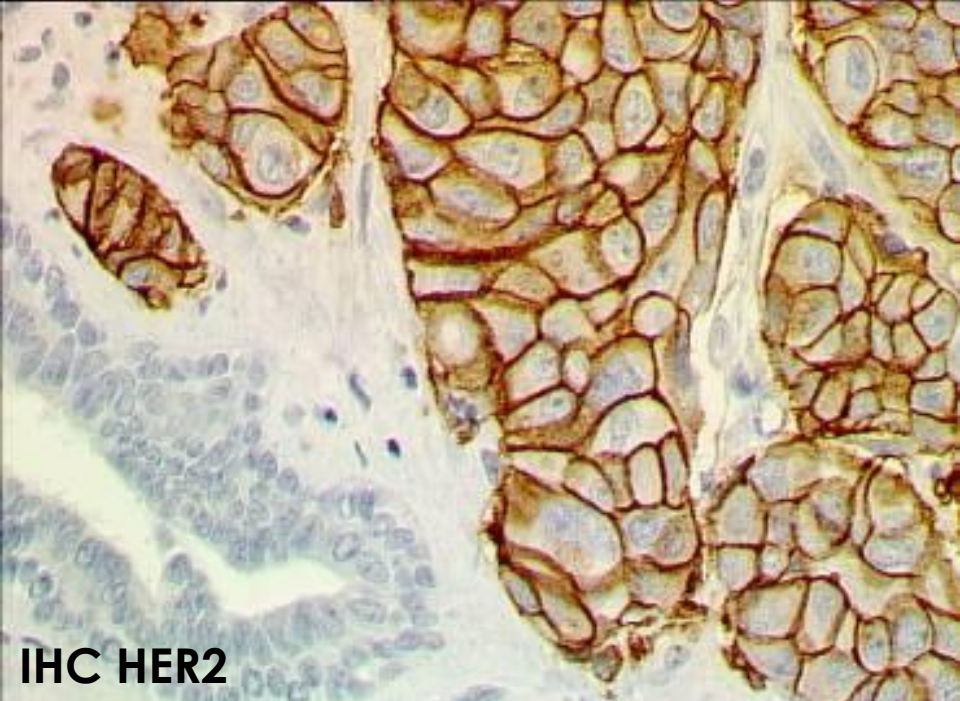


# Examens et modalités de conservation

Les examens se pratiquent :

- soit sur coupe tissulaire en paraffine (4 microns)
  - immunohistochimie (ACP)
  - hybridation in situ (ACP)
- soit à partir de fragments tissulaires ou de coupes épaisses (3-4 coupes de 10-15 microns)
  - immuno-analyse – ELISA (biochimie)
  - PCR/RT-PCR (biologie moléculaire)





## Techniques d'analyse standard et modalités de conservation tissulaire selon le biomarqueur

<b>Biomarqueur</b>	<b>Technique d'analyse standard</b>	<b>Modalité de conservation du tissu</b>
<b>RO</b>	IHC	paraffine
<b>RP</b>	IHC	paraffine
<b>HER2</b>	IHC HIS	paraffine
<b>Ki-67</b>	IHC	paraffine
<b>uPA/PAI-1</b>	ELISA	congélation
<b>Oncotype DX™</b>	RT-PCR	paraffine
<b>Mammaprint®</b>	RT-PCR	congélation ou RNALater®

<b>Technique alternative d'analyse</b>	<b>Modalité de conservation du tissu</b>
RT-PCR	congélation ou RNALater® ou éventuellement paraffine*
RT-PCR	congélation ou RNALater® ou éventuellement paraffine*
RT-PCR	congélation ou RNALater®
PCR	congélation ou paraffine
RT-PCR	congélation ou RNALater® ou éventuellement paraffine*
-	-
-	-
-	-

\* Après validation de la qualité de l'analyse car l'ARN sur tissu paraffiné est en partie dégradé

# Examens et modalités de conservation

Pour l'heure, il n'y a pas de recherche de mutations à visée thérapeutique.





# L'échantillon et son parcours

**L'échantillon** : portion de tissu tumoral destiné à l'analyse biologique ou l'examen ACP.

- Se veut représentatif de la tumeur dans sa globalité.
- La préservation de son contenu moléculaire doit faire l'objet de toutes les attentions.
- Sa qualité dépend des délais avant préservation et du mode de préservation.
- Toutes les étapes du traitement de l'échantillon font l'objet de recueils d'informations assurant la traçabilité de l'échantillon.



# L'échantillon et son parcours

L'échantillon subit des modifications physiques tout au long de son parcours allant du prélèvement à l'analyse technique.

On peut ainsi parler :

- d'échantillon initial, obtenu au moment du prélèvement (ou dans un délai rapproché du prélèvement)

*Carotte biopsique ou fragment tissulaire extrait de pièce opératoire*

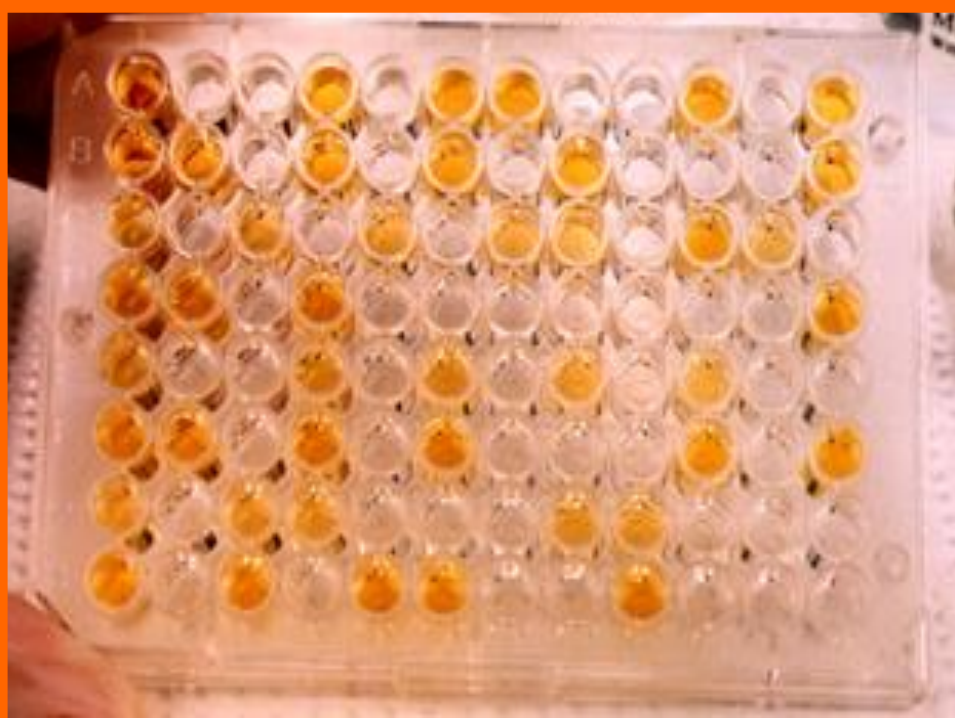
- d'échantillon final qui est celui analysé

*Lame blanche ou lysat cellulaire (après broyage)*





AFAQAP 2010  
IHC HER2  
Estomac



# L'échantillon et son parcours

## Les carottes biopsiques per-cutanées

Le geste de conservation (formol, RNALater<sup>®</sup>, congélation) est réalisé sur place vu la fragilité de l'échantillon sujet à dessiccation.

## Les pièces opératoires

- L'échantillonnage est réalisé par le chirurgien immédiatement après le prélèvement. L'échantillon est transmis au laboratoire fixé, congelé ou stabilisé dans du RNALater<sup>®</sup>.
- La pièce opératoire est acheminée entière vers le laboratoire d'ACP pour échantillonnage par le pathologiste. Le temps de transport doit alors être court.  
T° ambiante, atmosphère froide (4° C), pochettes sous-vide.



# Les points critiques à maîtriser

## **Protéine (IHC) ou ADN (HIS) sur tissu paraffiné :**

Pour les biopsies : fixation immédiate.

Pour les pièces op : délai avant fixation < 2 heures à 20° .

Fixation :  $\geq 6h$  pour biopsie et 24-48h pour pièce op.

## **ARN (RT-PCR)**

Echantillonner le plus vite possible après l'exérèse.

Congélation immédiate de l'échantillon dans l'azote liquide ou immersion dans du RNALater<sup>®</sup>.

Les contraintes de qualité pour l'analyse de l'ARN à haut débit (analyse du transcriptome sur puces Affymetrix, Agilent...) sont > à celles de la RT-PCR.



# Les points critiques à maîtriser

## **uPA/PAI-1 (ELISA)**

Délai avant la congélation des échantillons ne doit pas excéder 1h à 4° C.

N'opérer les patientes qu'après un délai de 15 jours après une ponction, le temps que les effets de la cicatrisation disparaissent.



# Les acteurs

Maîtriser l'étape pré-analytique demande une démarche coordonnée de plusieurs équipes ne travaillant :

- pas dans la même unité;
- pas dans le même lieu, le plus souvent.

Cela passe par un renforcement de l'information, de la formation et de la délégation de tâche.

# Les acteurs

## L'équipe de radiologie

On « capte » une biologie tumorale « native ». Mais :

- le prélèvement pour la biologie ne doit pas gêner le diagnostic ACP qui reste l'objectif premier,
- la quantité de tissu à fournir peut s'avérer insuffisante en cas de tumeur de petite taille.

L'idéal : une carotte tissulaire fixée et paraffinée autorisant la recherche de tous les biomarqueurs validés. Ce n'est pas le cas à ce jour puisque uPA/PAI-1 nécessite non seulement du tissu congelé mais aussi un volume assez important (50 mg, soit l'équivalent d'un cylindre tumoral de 2 mm de diamètre et 16 mm de long).



# Les acteurs

## L'équipe de chirurgie

Dispose de la tumeur dans sa totalité et dans son cadre. Elle :

- est protégée d'altérations de dessèchement.
- peut être altérée par un traitement néo-adjuvant ou des ponctions.
- doit être échantillonnée (pour examen au microscope ou analyse de biochimie ou de biologie moléculaire).
- est soumise aux temps d'ischémie (chaude et froide).

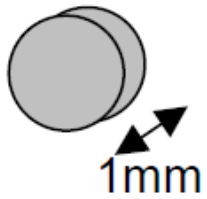
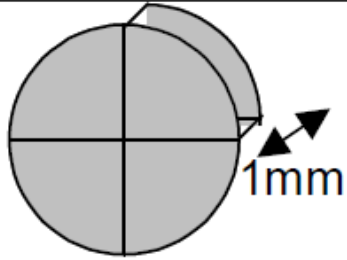
Tous ces points font que les conditions d'échantillonnage et de transport méritent d'être étroitement adaptées et discutées en concertation avec les pathologistes et les biologistes, en fonction des situations locales.



# Les acteurs

Echantillon de 50 mg minimum pour dosage d'uPA/PAI-1.

80 mg correspondent, sur une tranche de 1 mm d'épaisseur, à :

Taille de la tumeur	10 mm	20 mm
<b>Prélèvement pour avoir les 50 mg requis</b>	 <p>Tranche de 1 mm d'épaisseur (80 mg)</p>	 <p>Quartier de 1 mm d'épaisseur (80 mg)</p>

# Les acteurs

## L'équipe de pathologie

En charge des diagnostics.

En charge de la qualification des tissus.

Dans sa structure, le pathologiste met en place les procédures techniques permettant aux blocs en paraffine et aux lames paraffinées (lames blanches) de conserver au mieux la qualité biologique des tissus, et non plus seulement leur qualité structurale histologique et cytologique.

Lors des étapes préparatoires à la PCR, il s'attache à éliminer toute possibilité de « contamination » d'un tissu par un autre.

Accentue la charge de travail à l'intérieur des structures d'ACP.



# Les acteurs

## **L'équipe de biologie**

Qualité des résultats d'analyses biologiques.

Simplifier la gestion des tissus aux étapes pré-analytiques.



# Accréditation et délégation de tâche

## **Accréditation des laboratoires**

Obligatoire (2013 - 2016) - Ordonnance Ballereau 2010.

Participation à des contrôles qualité internes et externes.

Accent mis sur la maîtrise des étapes pré-analytiques où les cliniciens sont impliqués non seulement par les actes médico-techniques qu'ils réalisent mais aussi par le recueil de données alimentant la traçabilité des prélèvements.



# Accréditation et délégation de tâche

## **Délégation de tâches**

Objectif : fluidifier et fiabiliser les circuits.

Indispensable en raison de la charge de travail des médecins.

Demande de la formation et des preuves de compétence pour l'exercice donné.



# Focus sur uPA/PAI-1

Rapport SFSPM-INCa sur l'état des connaissances relatives à 3 biomarqueurs, dont uPA/PAI-1 (SFSPM 2009, Lyon).

Malgré un LOE I, uPA/PAI-1 est peu utilisé en France et dans d'autres pays au monde en raison de difficultés techniques et organisationnelles (nécessité de tissu congelé, technique d'analyse non en place dans la plupart des labos, technique d'analyse peu adaptée aux tumeurs de très petite taille).

Quelques labos étaient opérationnels en 2009.  
D'autres le seront début 2010.



# Conclusion

La prise en charge de l'échantillon tumoral entre le prélèvement et l'analyse (**phase pré-analytique**) influence la qualité des résultats.

Ses modalités sont **à adapter** en fonction des molécules recherchées et des techniques utilisées.

Les radiologues, chirurgiens et pathologistes sont **co-acteurs** pour optimiser cette phase.



Rigueur accrue dans des actions prédéfinies et sujettes à **traçabilité**.



