

## Guide multidisciplinaire de bonnes pratiques pour la prise en charge des petits prélèvements de tumeurs broncho-pulmonaires



Avec la participation de H. BEGUERET, G. BRAS, N. BRAZZALOTTO, F. CHOMY, L. DIGUE, A. HOURSANGOU, F. LAURENT, J-P. MERLIO et I. SOUBEYRAN

Le diagnostic de cancer du poumon est le plus souvent réalisé par des **biopsies tissulaires** chez des patients à un stade inopérable. Les biopsies broncho-pulmonaires ou transthoraciques représentent donc un matériel très précieux nécessaire au diagnostic anatomopathologique initial puis la détection de biomarqueurs de réponse thérapeutique par différentes techniques. L'objectif de ce guide est d'**optimiser la réalisation et l'utilisation de ces biopsies et donc d'améliorer la prise en charge des patients.**

Ce travail a été initié avec le réseau régional de Cancérologie d'Aquitaine. Il est prévu que ce guide aquitain soit ensuite validé par les professionnels de la Nouvelle-Aquitaine dans le cadre du Réseau Onco-Nouvelle-Aquitaine.

Le Groupe de travail qui a participé à la rédaction de ce guide de bonnes pratiques est constitué par :

- **Dr Hugues BEGUERET**, anatomopathologiste, service de pathologie, CHU de Bordeaux
- **Mr Grégory BRAS**, technicien, service de pathologie, CHU de Bordeaux
- **Mme Nadège BRAZZALOTTO**, chargée d'études, Onco-Nouvelle-Aquitaine
- **Dr François CHOMY**, pneumo-oncologue médical, Institut Bergonié, Bordeaux
- **Dr Laurence DIGUE**, coordinatrice Réseau Onco-Nouvelle-Aquitaine
- **Mme Aurore HOURSANGOU**, technicienne, service de pathologie, CHU de Bordeaux
- **Pr François LAURENT**, radiologue, service radiologie et imagerie médicale, CHU de Bordeaux
- **Pr Jean-Philippe MERLIO**, anatomopathologiste, service de biologie des tumeurs-tumorothèque, CHU de Bordeaux, Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers d'Aquitaine
- **Dr Isabelle SOUBEYRAN**, anatomopathologiste, unité de pathologie moléculaire, Institut Bergonié, Bordeaux, Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers d'Aquitaine.

# Sommaire

---

 <b>GLOSSAIRE</b> .....	<b>6</b>	 2- Analyses anatomo-pathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter .....	<b>19</b>
 <b>ONCOLOGUES</b> .....	<b>7</b>	 3- Fixation .....	<b>20</b>
Analyses anatomo-pathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter .....	<b>8</b>	 <b>COURSIEERS</b> .....	<b>23</b>
 <b>PNEUMOLOGUES, CHIRURGIENS et RADIOLOGUES</b> .....	<b>11</b>	Les bonnes pratiques de transport des prélèvements .....	<b>24</b>
1- Analyses anatomo-pathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter .....	<b>12</b>	 <b>PATHOLOGISTES ET TECHNICIENS</b> .....	<b>27</b>
2- Prélèvement.....	<b>13</b>	1- Fixation .....	<b>28</b>
3- Fixation .....	<b>13</b>	A. Délais de fixation .....	<b>28</b>
4- Transmission du prélèvement .....	<b>14</b>	B. Volume de fixateur.....	<b>28</b>
 <b>CADRES, INFIRMIERS, MANIPULATEURS RADIO</b> .....	<b>17</b>	C. Choix du fixateur .....	<b>28</b>
1- Transmission du prélèvement .....	<b>18</b>	D. Décalcification.....	<b>28</b>
		2- Analyses anatomo-pathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter .....	<b>29</b>

<b>3- Gestion technique des petits prélèvements :</b>	
économiser le matériel.....	<b>31</b>
A. Inclusion des biopsies .....	<b>31</b>
B. Cytoponctions EBUS, EUS et liquides d'épanchement des séreuses.....	<b>31</b>
C. Coupe.....	<b>31</b>
D. Conservation.....	<b>31</b>
<b>4- Algorithme de prise en charge des petits prélèvements de tumeurs broncho-pulmonaires par le pathologiste .....</b>	<b>32</b>
<b>5- Détermination du statut PD-L1 par immunohistochimie.....</b>	<b>33</b>
<b>6- Détermination du statut ALK par immunohistochimie.....</b>	<b>37</b>
<b>7- Détermination du statut ROS1 par immunohistochimie.....</b>	<b>40</b>

 <b>PLATEFORME DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES CANCERS .....</b>	<b>45</b>
<b>1- Conditions d'envoi et de sélection du matériel par le pathologiste .....</b>	<b>46</b>
<b>2- Conditions d'acceptation de l'analyse .....</b>	<b>46</b>
<b>3- Comment évaluer la cellularité tumorale ? .....</b>	<b>47</b>
<b>4- Analyses effectuées .....</b>	<b>47</b>
<b>5- Analyses anatomo-pathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter .....</b>	<b>48</b>
<b>6- Techniques de biologie moléculaire .....</b>	<b>50</b>
Illustration FISH .....	<b>51</b>
Illustration Fréquence des altérations génétiques ...	<b>52</b>
Illustration Procédure de demande d'analyse moléculaire à la PGMC de Bordeaux .....	<b>52</b>
Bibliographie .....	<b>56</b>
Mentions légales .....	<b>57</b>

# Glossaire

---

**AFAQAP** : Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**CBNPC** : Carcinome Bronchique Non à Petites Cellules

**CR** : Compte-Rendu

**EBUS** : Echoendoscopie transbronchique

**FFPE** : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissue

**RIHN** : Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature

**EDTA** : Acide Éthylène diamine tétraacétique

**EUS** : Echographie endoscopique

**FISH** : Hybridation In Situ Fluorescente

**HES** : Hématoxyline Éosine Safran

**IHC** : ImmunoHistoChimie

**INCa** : Institut National du Cancer

**NGS** : Next-Generation Sequencing ou Séquençage Nouvelle Génération

**MSSanté** : Messagerie Sécurisée de Santé

**PCR** : Polymerase Chain Réaction

**PGMC** : Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers

**UKNEQAS** : United Kingdom National External Quality Assessment Service



*Guide multidisciplinaire  
de bonnes pratiques*

# ONCOLOGUES

## Analyses anatomo-pathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter :

### ► L'examen anatomo-pathologique permet :

- d'identifier le type histologique de carcinome
- de déterminer par immunohistochimie :
  - le statut **ALK** et **ROS1** pour tout CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique
  - le statut **PD-L1** pour tout CBNPC localement avancé ou métastatique
- de sélectionner les cas nécessitant une confirmation ALK ou ROS1 par FISH. **En cas de score ALK 3+ en immunohistochimie, la FISH n'est plus exigée pour la prescription du traitement.**
- de sélectionner et transmettre pour tout CBNPC non épidermoïde le prélèvement adéquat aux plateformes de biologie moléculaire.

### ► L'examen par biologie moléculaire

permet d'identifier des altérations moléculaires potentiellement ciblables par les inhibiteurs de tyrosine kinase.

► En tenant compte des durées de fixation et des délais d'immunohistochimie et de biologie moléculaire :

- **un délai de 3 à 7 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire en fonction du type de prélèvement pour l'obtention du **compte-rendu diagnostique**
- **un délai de 7 à 14 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire pour l'obtention du **compte-rendu de biologie moléculaire**. Les appels téléphoniques ne modifient pas ces délais, contrairement à la mise en place d'une messagerie MSSanté, qui permet un envoi automatisé et sécurisé dès que le compte-rendu est validé.



**Sensibiliser le patient à ces délais «incompressibles»**



# Notes



A series of ten horizontal dotted orange lines spaced evenly down the left side of the page, providing a template for handwritten notes.

A series of ten horizontal dotted orange lines spaced evenly down the right side of the page, providing a template for handwritten notes.



*Guide multidisciplinaire  
de bonnes pratiques*

# **PNEUMOLOGUES, CHIRURGIENS et RADIOLOGUES**

Pneumologues, chirurgiens  
et radiologues

# 1- Analyses anatomopathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter

---

## ► L'examen anatomopathologique permet :

- d'identifier le type histologique de carcinome
- de déterminer par immunohistochimie :
  - le statut **ALK** et **ROS1** pour tout CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique
  - le statut **PD-L1** pour tout CBNPC localement avancé ou métastatique
- de sélectionner les cas nécessitant une confirmation ALK ou ROS1 par FISH. **En cas de score ALK 3+ en immunohistochimie, la FISH n'est plus exigée pour la prescription du traitement.**
- de sélectionner et transmettre pour tout CBNPC non épidermoïde le prélèvement adéquat aux plateformes de biologie moléculaire.

► L'examen par biologie moléculaire permet d'identifier des altérations moléculaires potentiellement ciblables par les inhibiteurs de tyrosine kinase.

► En tenant compte des durées de fixation et des délais d'immunohistochimie et de biologie moléculaire :

- **un délai de 3 à 7 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire en fonction du type de prélèvement pour l'obtention du **compte-rendu diagnostique**
- **un délai de 7 à 14 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire pour l'obtention du **compte-rendu de biologie moléculaire**

Les appels téléphoniques ne modifient pas ces délais, contrairement à la mise en place d'une messagerie MSSanté, qui permet un envoi automatisé et sécurisé dès que le compte-rendu est validé.



Sensibiliser le patient à ces délais «incompressibles»

## 2- Prélèvement

---

- Le prélèvement par fibroscopie ou par voie transthoracique sous contrôle scannographique doit être organisé dès que possible.
- **Un minimum de 5 biopsies tumorales** doit être, si possible, réalisé [1].
- Le prélèvement est effectué au moyen d'une aiguille coupante coaxiale.
- La taille du prélèvement varie selon le diamètre de la tumeur et les avancées possibles de l'aiguille choisie.
- Dans la mesure du possible, effectuer **3 prélèvements** avec **des angles de tirs différents** pour prélever des échantillons dans des zones différentes.

## 3- Fixation

---

- ▶ Elle doit être réalisée **immédiatement** (temps d'ischémie froide le plus court possible).
- ⚠ Ne pas adresser de biopsie à l'état frais ou dans le RNA later (absence de recommandation nationale de cryoconservation des cancers pulmonaires) sauf protocole thérapeutique.
- ▶ **Type de fixateur : formol tamponné neutre à 10 %**
  - Les prélèvements sont placés immédiatement dans le formol tamponné neutre à 10% et envoyés le plus vite possible au laboratoire. Si aucune biopsie n'est obtenue, un étalement sur lame du matériel de cytoponction est effectué.
  - **Un délai de 3 à 7 jours** est nécessaire pour le résultat histologique.



La qualité du diagnostic dépend du respect des conditions de fixation

## 4-Transmission du prélèvement

---

- Veiller à la présence de renseignements indiquant :
  - l'identification du patient
  - le site de prélèvement
  - la situation clinique (pathologie métastatique, statut tabagique)
  - la date et l'heure du prélèvement
  - l'identification du préleveur
- En cas de rebiopsie, préciser la nature de la pathologie et les altérations initiales.

# Notes



A series of ten horizontal dotted orange lines, providing a template for handwritten notes on the left side of the page.

A series of ten horizontal dotted orange lines, providing a template for handwritten notes on the right side of the page.

# Notes



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



*Guide multidisciplinaire  
de bonnes pratiques*

# **CADRES, INFIRMIERS, MANIPULATEURS RADIO**

# 1-Transmission du prélèvement

- Veiller à la présence de renseignements sur le pot et le bon de demande d'examen indiquant :
  - l'identification du patient
  - le site de prélèvement
  - la situation clinique (pathologie métastatique)
  - la date et l'heure du prélèvement
  - l'identification du préleveur

EXAMEN LOGIQUE

Service demandeur : Endoscopie

Prescripteur (en toutes lettres) : \_\_\_\_\_

Date du prélèvement : 24-08-18 Heure du prélèvement : 9h15

Préleveur (en toutes lettres) : \_\_\_\_\_

Type de prélèvement :  Biopsie :  état frais  Fixé  
 Pièce opératoire :  état frais  Fixé

Heure de mise du prélèvement dans le fixateur : \_\_\_\_\_

Numéro de téléphone à joindre pour le résultat : \_\_\_\_\_

Organe : Poumon côté  gauche  droit

Date de la prochaine consultation prévue pour le rendu de résultat : \_\_\_\_\_

**Renseignements cliniques :**

Opacité lobaire sup droite  
Patient polymétastatique

*(Cliché issu de la collection personnelle du Dr Isabelle Soubeyran,  
Institut Bergonié, Bordeaux)*

## 2- Analyses anatomopathologique et moléculaire, des délais minimum à respecter

### ► L'examen anatomopathologique permet :

- d'identifier le type histologique de carcinome
- de déterminer par immunohistochimie :
  - le statut **ALK** et **ROS1** pour tout CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique
  - le statut **PD-L1** pour tout CBNPC localement avancé ou métastatique
- de sélectionner les cas nécessitant une confirmation ALK ou ROS1 par FISH. **En cas de score ALK 3+ en immunohistochimie, la FISH n'est plus exigée pour la prescription du traitement.**
- de sélectionner et transmettre pour tout CBNPC non épidermoïde le prélèvement adéquat aux plateformes de biologie moléculaire.

► **L'examen par biologie moléculaire** permet d'identifier des altérations moléculaires potentiellement ciblables par les inhibiteurs de tyrosine kinase.

► En tenant compte des durées de fixation et des délais d'immunohistochimie et de biologie moléculaire :

- **un délai de 3 à 7 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire en fonction du type de prélèvement pour l'obtention du **compte-rendu diagnostique**

- **un délai de 7 à 14 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire pour l'obtention du **compte-rendu de biologie moléculaire.**

Les appels téléphoniques ne modifient pas ces délais, contrairement à la mise en place d'une messagerie MSSanté, qui permet un envoi automatisé et sécurisé dès que le compte-rendu est validé.



**Sensibiliser le patient à ces délais «incompressibles»**

### 3- Fixation

---

▶ Elle doit être réalisée **immédiatement**  
(temps d'ischémie froide le plus court possible).

⚠ Ne pas adresser de biopsie à l'état frais (absence de recommandation nationale de cryoconservation des cancers pulmonaires) sauf si précisé dans le cadre d'essais cliniques.

▶ **Type de fixateur : formol tamponné neutre à 10 %**



**La qualité du diagnostic dépend du respect des conditions de fixation**

# Notes



A series of ten horizontal dotted orange lines providing a space for handwritten notes on the left side of the page.

A series of ten horizontal dotted orange lines providing a space for handwritten notes on the right side of the page.

# Notes



A series of ten horizontal dotted lines spanning the width of the page, providing a structured area for taking notes.

A series of ten horizontal dotted lines spanning the width of the page, providing a structured area for taking notes.



© L. Bousseaud -  
SIRIC BRIO -  
CHU de Bordeaux

*Guide multidisciplinaire  
de bonnes pratiques*

# COURSIERS

# Les bonnes pratiques de transport des prélèvements

---

- ▶ Vérifier le bon emballage des prélèvements.
- ▶ S'assurer :
  - que les prélèvements étiquetés sont systématiquement accompagnés du **bon de demande** d'examens
  - que les prélèvements sont acheminés **le plus rapidement** possible
  - de leur **traçabilité** (identifiant patient, coordonnées de l'expéditeur et du destinataire...).

# Notes



Handwriting practice lines on the left side of the page, consisting of ten horizontal dotted lines.

Handwriting practice lines on the right side of the page, consisting of ten horizontal dotted lines.

# Notes



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

© L. Bousseaud -  
SIRIC BRIO -  
CHU de Bordeaux



*Guide multidisciplinaire  
de bonnes pratiques*

# **PATHOLOGISTES ET TECHNICIENS**

# 1. Fixation

---

## A. Délais de fixation

- ▶ Temps d'ischémie froide le plus court possible (fixation immédiate)
- ▶ Durée de fixation pour les biopsies : minimum 6 h / maximum 72 h



La sous-fixation est délétère et rend l'examen non interprétable



Le calcul du temps de fixation exact n'est possible que si l'heure du début de la fixation est renseignée

## B. Volume de fixateur

Volume de fixateur = 10 fois celui du prélèvement

## C. Choix du fixateur

- ▶ **Formol tamponné neutre à 10 %**  
Les anticorps, sondes et techniques ont été mis au point et validés avec ce fixateur qui est le **standard**.



La qualité du diagnostic dépend du respect des conditions de fixation

## D. Décalcification

Pour toute biopsie nécessitant une décalcification, elle ne doit être réalisée que par **bains d'EDTA (0,5 M, pH8)** après fixation dans le formol tamponné neutre à 10% [2] ou dans une solution de décalcification à base d'acide formique (Décalcifiant Shandon TBD-2™, Thermo Fisher Scientific - Décalcifiant Q Path® DC1, VWR) [3].

## 2. Analyses anatomopathologique et moléculaire, des délais minimums à respecter

---

### ► L'examen anatomopathologique permet :

- d'identifier le type histologique de carcinome
- de déterminer par immunohistochimie :
  - le statut ALK et ROS1 pour tout CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique
  - le statut PD-L1 pour tout CBNPC localement avancé ou métastatique

- de sélectionner les cas nécessitant une confirmation ALK ou ROS1 par FISH. **En cas de score ALK 3+ en immunohistochimie, la FISH n'est plus exigée pour la prescription du traitement contrairement à ROS1 pour lesquels les cas positifs en IHC doivent être contrôlés en FISH.**
- de sélectionner et transmettre pour tout CBNPC non épidermoïde le prélèvement adéquat aux plateformes de biologie moléculaire.

► **L'examen par biologie moléculaire**

permet d'identifier des altérations moléculaires potentiellement ciblables par les inhibiteurs de tyrosine kinase.

► En tenant compte des durées de fixation et des délais d'immunohistochimie et de biologie moléculaire :

• **un délai de 3 à 7 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire en fonction du type de prélèvement pour l'obtention du **compte-rendu diagnostique**

• **un délai de 7 à 14 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire pour l'obtention du **compte-rendu de biologie moléculaire**.

Les appels téléphoniques ne modifient pas ces délais, contrairement à la mise en place d'une messagerie MSSanté, qui permet un envoi automatisé et sécurisé dès que le compte-rendu est validé.



**Sensibiliser le clinicien à ces délais «incompressibles»**

## 3- Gestion technique des petits prélèvements : économiser le matériel

### A. Inclusion des biopsies

⚠ **Ne pas inclure toutes les biopsies dans le même bloc** dans un souci d'économie du matériel tumoral (1 à 3 biopsies / bloc).

L'utilisation d'une **paraffine à point de fusion bas** (< 60°C) est recommandée.

### B. Cytoponctions EBUS, EUS et liquides d'épanchement des séreuses

Réaliser systématiquement un **cytobloc** pour immunohistochimie et éventuel génotypage.

### C. Coupe

- ▶ La qualité des coupes impose :
  - un microtome régulièrement entretenu
  - un personnel entraîné et sensibilisé.

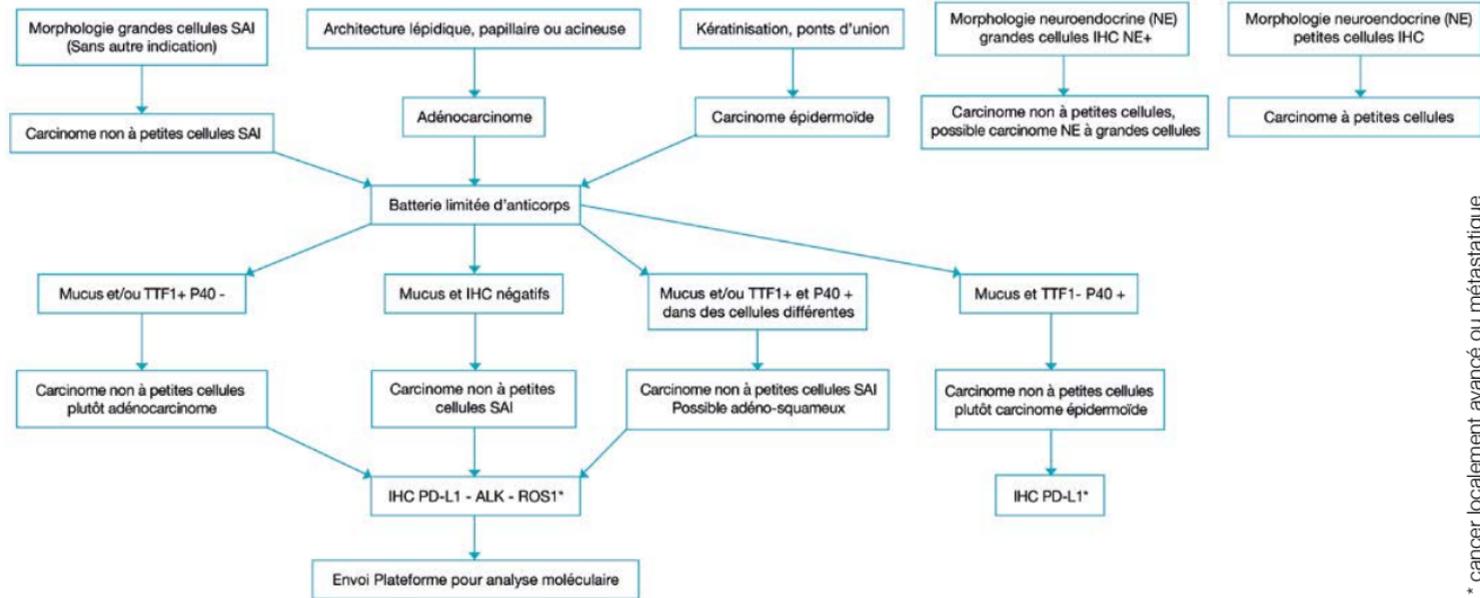
**Procédure pour la réalisation des lames** de prélèvements biopsiques :

- réaliser 6 ou 7 lames blanches sériées après l'HES (1 niveau / lame) pour éviter l'entame répétée du bloc, épaisseur 2 à 4 µm selon les pratiques
- Le premier et le dernier niveau de coupe, encadrant ainsi les 6 niveaux utilisés pour les lames blanches seront colorés en HES.

### D. Conservation

- ▶ La durée de conservation des lames blanches est :
  - **de 2 semaines maximum à température ambiante** avant la technique d'IHC pour les témoins <sup>[4]</sup>
  - il est conseillé de faire les coupes au moment ou la veille de la technique.
- ▶ Pour le stockage des lames blanches à température ambiante, il est recommandé de les enrober de paraffine (éviter le stockage dans l'étuve).

## 4- Algorithme de prise en charge des petits prélèvements de tumeurs broncho-pulmonaires par le pathologiste



\* cancer localement avancé ou métastatique

## 5 - Détermination du statut PD-L1 par immunohistochimie

⚠ Test systématique, pour tout CBNPC localement avancé ou métastatique, à réaliser systématiquement dès le diagnostic.

### Immunothérapies dont la prescription nécessite un test PD-L1 (octobre 2018) :

Laboratoire	MSD	Bristol-Myers-Squibb	AstraZeneca	Roche	Merck/Pfizer
Molécule	Pembrolizumab* (anti-PD-1)	Nivolumab (anti-PD-1)	Durvalumab (anti-PD-L1)	Atezolizumab* (anti-PD-L1)	Avelumab (anti-PD-L1)
Industrie	DAKO VENTANA	DAKO	VENTANA	VENTANA	DAKO
Anticorps	22C3 ou SP263	28-8	SP263	SP142	73-10
Score sur CT	Score sur CT	Score sur CT	Score sur CT	Score sur CT + CI	Score sur CT
AMM dépendante du score PD-L1	Seconde ligne : PD-L1 $\geq 1\%$ Première ligne : PD-L1 $\geq 50\%$	Seconde ligne : pas de testing pour la prescription	AMM : PD-L1 $\geq 1\%$		

CT : cellules tumorales CI : cellules immunitaires  
\* Patients EGFR et ALK négatifs

### ► Les anticorps recommandés

Les études d'harmonisation [7] ont montré pour l'évaluation des cellules tumorales (CT) une bonne concordance entre les tests standardisés 28-8 (Agilent/Dako), 22C3 (Agilent/Dako) et SP263 (Ventana), mais également entre les anticorps primaires concentrés 28-8 (Agilent/Dako), 22C3 (Agilent/Dako), SP263 (Ventana) et E1L3N (Cell Signaling) sur les plateformes Dako, Leica et Ventana. **L'anticorps SP263** ressort comme l'anticorps ayant le taux de concordance le plus élevé sur toutes les plateformes.

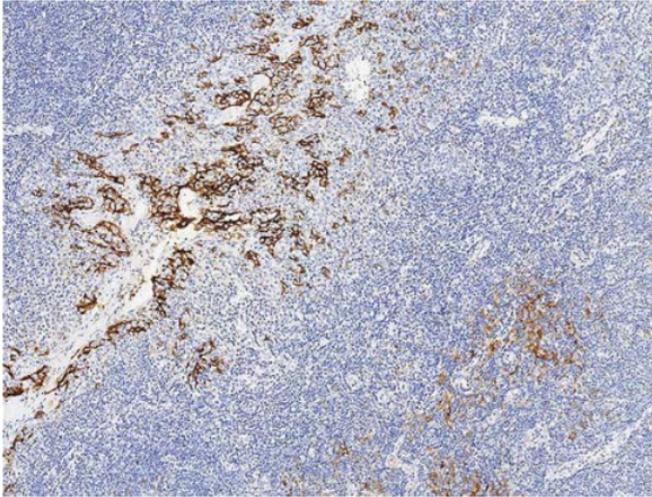
Il existe également d'autres anticorps plus récemment développés (ex : QR1, Diagnostics®, marqué CE-IVD). Leur utilisation en pratique nécessite une étude préalable de concordance avec l'un des clones mentionnés ci-dessus.

### ► L'interprétation de l'immunomarquage [8] [9]

- Un **témoin externe positif** (amygdale, placenta, lignée cellulaire) doit être déposé sur chaque lame.
  - **Seules les CT doivent être évaluées à ce jour.** Un minimum de **100 CT** analysables est recommandé.
  - Exclure les zones de nécrose.
  - Le **score** correspond au **pourcentage de CT marquées sur l'ensemble de la tumeur** présente sur la lame.
  - **Seul le marquage membranaire linéaire** doit être considéré, qu'il soit **complet ou incomplet**, quelle qu'en soit l'intensité [8].
- Nécessité de participer régulièrement à des **programmes d'évaluation externe de qualité** (AFAQAP - [www.afaqap.fr](http://www.afaqap.fr), UKNEQAS - [ukneqas.org.uk](http://ukneqas.org.uk)...).

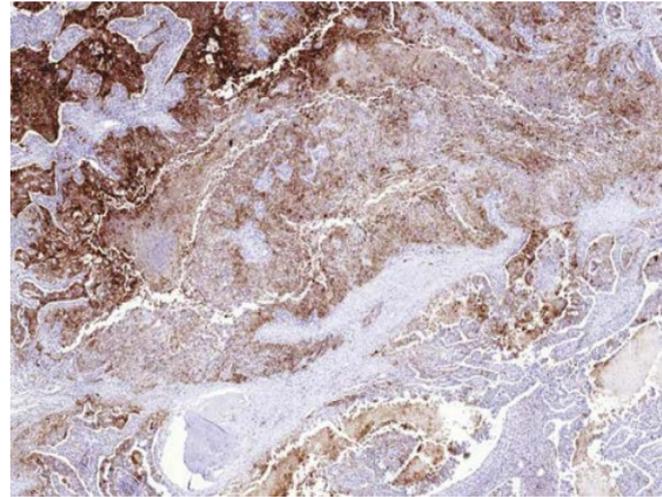
### Témoign positif - Amygdale

Marquage des cellules épithéliales des cryptes et des macrophages notamment au niveau des centres germinatifs



### Marquage PD-L1 d'un CBNPC

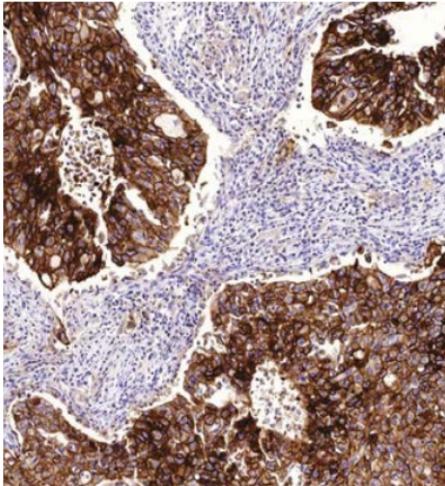
Marquage hétérogène au sein de la tumeur



*(Clichés issus de la collection personnelle du Dr Hugues Bégueret, CHU de Bordeaux)*

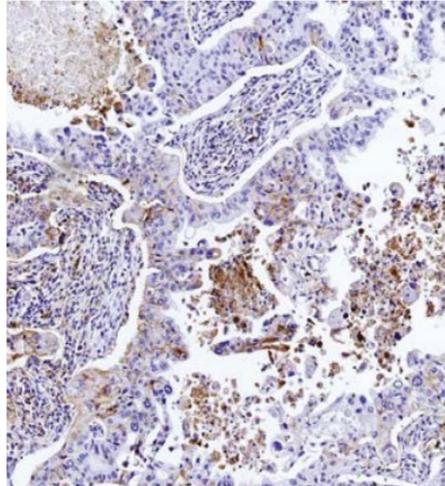
### Marquage PD-L1 d'un CBNPC

Fort expresseur (PD-L1 > 50%)



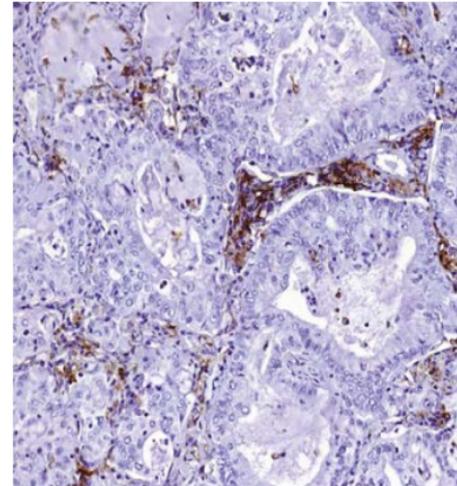
### Marquage PD-L1 d'un CBNPC

Faible expresseur (PD-L1 de 1 à 49%)  
(marquage non spécifique par la nécrose tumorale)



### Marquage PD-L1 d'un CBNPC

Absence d'expression de PD-L1 par les CT  
(Cellules Immunitaires marquées)



*(Clichés issus de la collection personnelle du Dr Hugues Bégueret, CHU de Bordeaux)*

## 6- Détermination du statut ALK par immunohistochimie

Pour tout CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique, le test ALK doit être réalisé systématiquement dès le diagnostic.

### ► Les anticorps anti-ALK recommandés :

- anticorps concentrés clones 5A4 (Novocastra, Leica Biosystems), D5F3 (Cell Signaling Technology) ou de nouveaux clones comme 1A4 (Origene, Diagnostics marqué CE-IVD) ou OT11A4
- test standardisé (Kit D5F3-Optiview Ventana IVD) sur automate Ventana [10].

*NB : L'utilisation du clone ALK1 (ou SP8) est à proscrire dans cette indication à cause de son manque de sensibilité.*

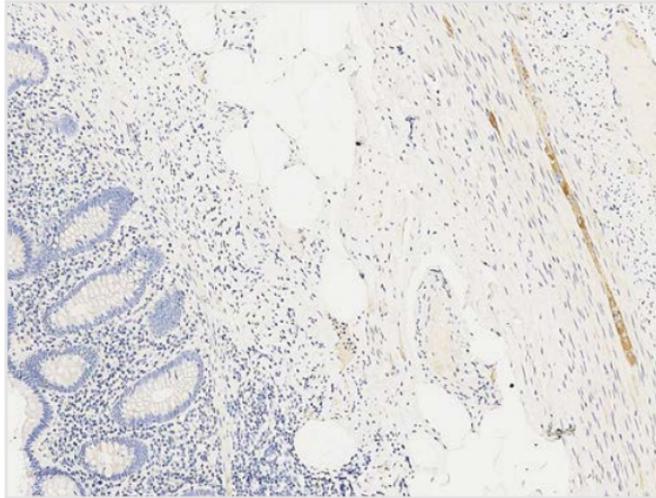
### ► L'interprétation de l'immunomarquage :

- le marquage est **cytoplasmique**, en général diffus dans la quasi-totalité des cellules tumorales

- le marquage peut être plus faible dans les adénocarcinomes mucineux (risque de faux négatif)
- un **témoin externe positif** (appendice (plexus nerveux) ou lignée cellulaire H3122-variant 1 et H2228-variant 3) doit être déposé sur chaque lame
- **score** de l'intensité du marquage : 3+ (visible au grossissement x2 ou x4) ; 2+ (visible au x10 ou x20) ; 1+ (visible au x40) ; 0 (absence de marquage)
- les cas douteux en IHC (intensité de marquage faible ou modérée -score 1+ ou 2+) doivent être contrôlés par **technique FISH**. En cas de score 3+, la FISH n'est plus exigée pour la prescription du traitement
- participer régulièrement à des **programmes d'évaluation externe de qualité** (AFAQAP - [www.afaqap.fr](http://www.afaqap.fr), UKNEQAS - [ukneqas.org.uk](http://ukneqas.org.uk)...).

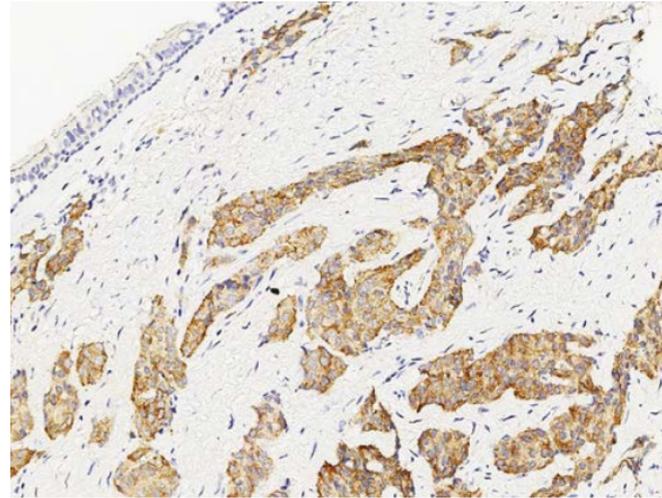
### Témoïn positif - Appendice

Appendice : témoïn positif externe par les cellules des plexus myentériques



### Adénocarcinome pulmonaire

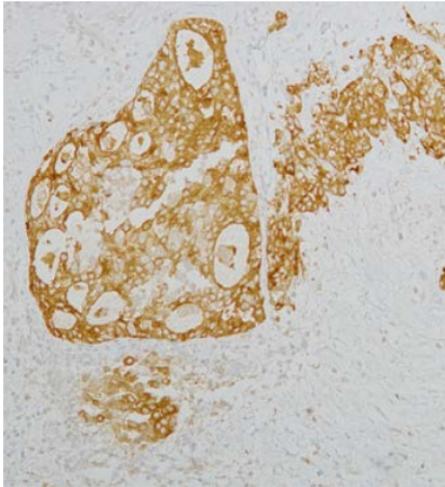
Expression cytoplasmique diffuse de ALK par les cellules tumorales (score 3+)



*(Clichés issus de la collection personnelle du Dr Hugues Bégueret, CHU de Bordeaux)*

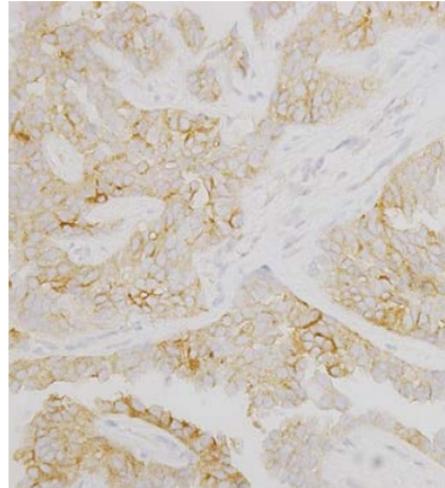
### Adénocarcinome pulmonaire

Expression cytoplasmique diffuse forte 3+ de ALK par les cellules tumorales visible au grossissement x200 (FISH ALK+)



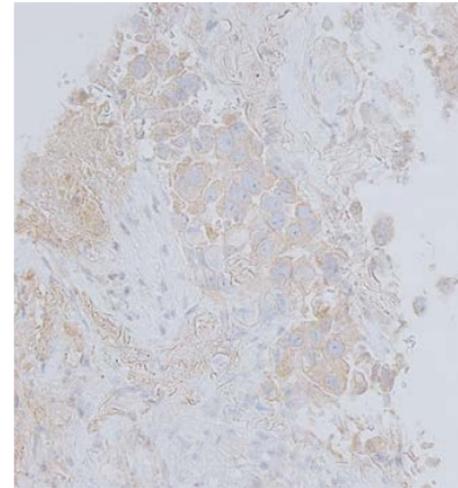
### Adénocarcinome pulmonaire

Expression modérée hétérogène 2+ de ALK par les cellules tumorales visible au grossissement x400 (FISH ALK-)



### Adénocarcinome pulmonaire

Expression cytoplasmique diffuse faible 1+ de ALK par les cellules tumorales visible au grossissement x400 (FISH ALK-)



*(Clichés issus de la collection personnelle du Dr Isabelle Soubeyran, Institut Bergonié, Bordeaux)*

## 7- Détermination du statut ROS1 par immunohistochimie

---

Pour tout CBNPC non épidermoïde, localement avancé ou métastatique, le test ROS1 doit être réalisé systématiquement dès le diagnostic.

► **Anticorps anti-ROS1 recommandé :**

- anticorps concentré clone D4D6 (Cell Signaling Technology) [11].

► L'interprétation de l'immunomarquage :

- le **marquage est cytoplasmique**, en général diffus dans la quasi-totalité des cellules tumorales
- possibilité d'un marquage non spécifique des pneumocytes de type 2
- un **témoin externe positif** (tumeur positive ou lignée cellulaire HCC78...) doit être déposé sur chaque lame

- **score** de l'intensité du marquage : 3+ (visible au grossissement x2 ou x4) ; 2+ (visible au x10 ou x20) ; 1+ (visible au x40) ; 0 (absence de marquage).

⚠ **Les cas positifs en IHC doivent être systématiquement contrôlés par technique FISH.**

► Participer régulièrement à des **programmes d'évaluation externe de qualité** (AFAQAP - [www.afaqap.fr](http://www.afaqap.fr), UKNEQAS - [ukneqas.org.uk](http://ukneqas.org.uk)...).

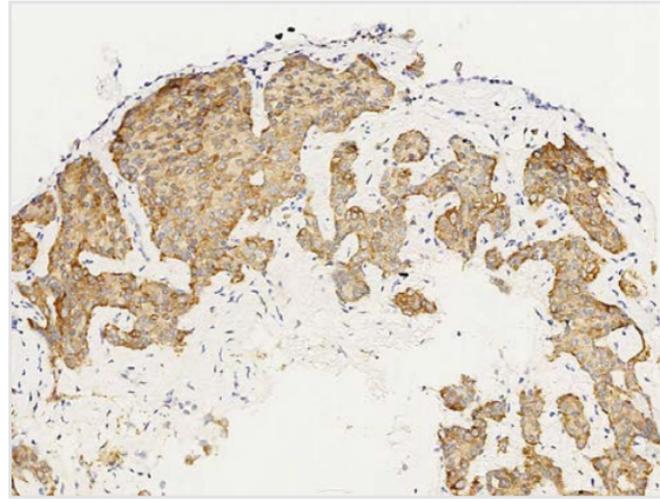
### Témoin positif

Lignée cellulaire HCC78



### Adénocarcinome pulmonaire

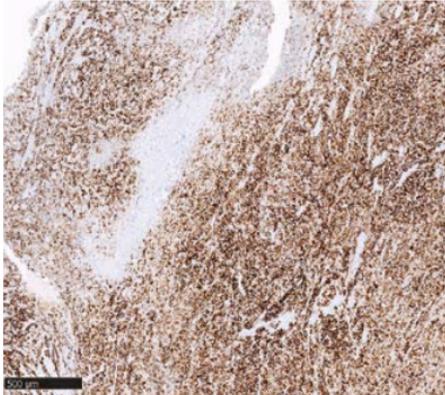
Expression cytoplasmique diffuse de ROS1 par les cellules tumorales (score 3+)



*(Clichés issus de la collection personnelle du Dr Hugues Bégueret, CHU de Bordeaux)*

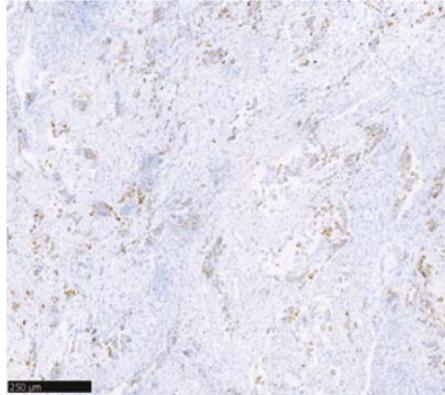
### Adénocarcinome pulmonaire

Score 3+ - marquage cytoplasmique diffus d'intensité forte visible dès le grossissement x40



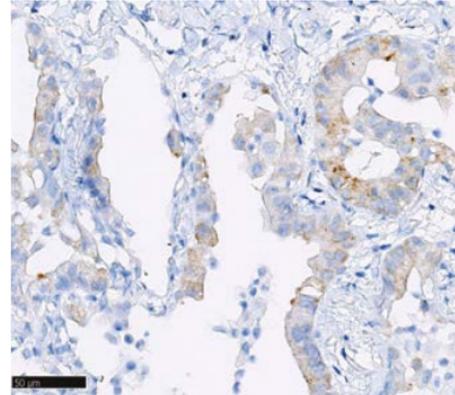
### Adénocarcinome pulmonaire

Score 2+ - marquage cytoplasmique diffus d'intensité modérée visible au grossissement x100



### Adénocarcinome pulmonaire

Score 1+ - marquage cytoplasmique d'intensité faible visible au grossissement x400



*(Clichés issus de la collection personnelle du Dr Hugues Bégueret, CHU de Bordeaux)*

# Notes



A series of ten horizontal dotted lines, intended for writing notes.

A series of ten horizontal dotted lines, intended for writing notes.

# Notes



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

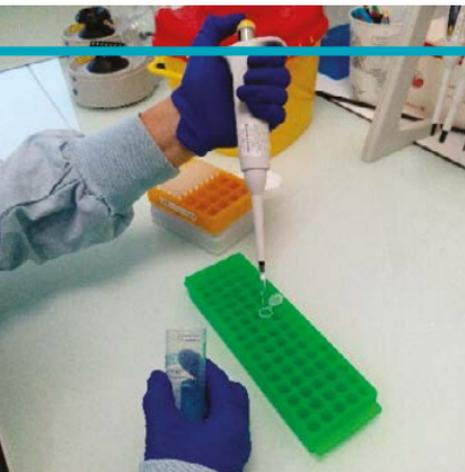
.....

.....

.....

.....

.....



© L. Bousseaud -  
SIRIC BRIO -  
CHU de Bordeaux

*Guide multidisciplinaire  
de bonnes pratiques*

# **PLATEFORME DE GENETIQUE MOLECULAIRE DES CANCERS**

## 1. Conditions d'envoi et de sélection du matériel par le pathologiste

---

► Bloc FFPE + lame HES, à envoyer :

- à **température ambiante**
- par **voie postale**
- dans un **triple emballage** (sachet plastique + enveloppe à bulles + enveloppe d'envoi)
- accompagné du **CR du pathologiste** et de la **feuille de prescription de la PGMC** (disponible et mise à jour annuellement sur le site Internet du Réseau de Cancérologie d'Aquitaine : <http://www.canceraquitaine.org/>).

Un courrier d'accompagnement est inutile. Il convient d'identifier sur la feuille de prescription le **prescripteur clinicien et l'établissement du prescripteur** (selon les modalités de facturation RIHN) et le **pathologiste**, à qui les résultats seront adressés. (cf p.50)

► **Choisir le bloc le plus riche en cellules tumorales.**

## 2. Conditions d'acceptation de l'analyse

---

► A réception du prélèvement, la plateforme vérifie :

- la **conformité du matériel** (identité entre le bloc, la lame, le CR et la feuille de prescription)
- la **conformité de la prescription** (stade avancé ou métastatique, type histologique)
- la **conformité des analyses demandées** en fonction des recommandations nationales ou régionales
- qu'il reste du matériel tumoral sur le bloc.

### 3. Comment évaluer la cellularité tumorale

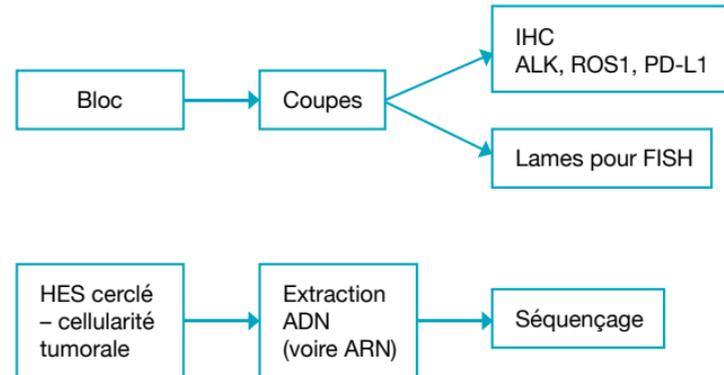
► Si cela n'a pas été fait par le pathologiste initial, le **pourcentage de cellules tumorales (CT)** est déterminé dans la zone ou fragment le plus riche en CT :

$$\% \text{ CT} = \frac{\text{Nombre de noyaux de cellules tumorales}}{\text{Nombre total de noyaux de cellules}}$$

Cette zone sera soumise à l'analyse de biologie moléculaire soit par forage du bloc soit par grattage. Si la cellularité globale le permet (>10%) on peut recueillir 2 à 5 coupes dans un tube pour l'extraction.

► La quantité de matériel restant et le nombre de fragments contenant des cellules tumorales permettront de hiérarchiser extraction puis coupe ou l'inverse.

### 4. Analyses effectuées



## 5. Analyses anatomopathologique et moléculaire, des délais minimums à respecter

---

### ► L'examen anatomopathologique permet :

- d'identifier le type histologique de carcinome
- de déterminer par immunohistochimie :
  - le statut ALK et ROS1 pour tout CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique
  - le statut PD-L1 pour tout CBNPC localement avancé ou métastatique

- de sélectionner les cas nécessitant une confirmation ALK ou ROS1 par FISH. **En cas de score ALK 3+ en immunohistochimie, la FISH n'est plus exigée pour la prescription du traitement contrairement à ROS1 pour lesquels les cas positifs en IHC doivent être contrôlés en FISH.**

- de sélectionner et transmettre pour tout CBNPC non épidermoïde le prélèvement adéquat aux plateformes de biologie moléculaire.

► **L'examen par biologie moléculaire**

permet d'identifier des altérations moléculaires potentiellement ciblables par les inhibiteurs de tyrosine kinase.

► En tenant compte des durées de fixation et des délais d'immunohistochimie et de biologie moléculaire :

• **un délai de 3 à 7 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire en fonction du type de prélèvement pour l'obtention du **compte-rendu diagnostique**

• **un délai de 7 à 14 jours** (à réception du prélèvement) est nécessaire pour l'obtention du **compte-rendu de biologie moléculaire**.

Les appels téléphoniques ne modifient pas ces délais, contrairement à la mise en place d'une messagerie MSSanté, qui permet un envoi automatisé et sécurisé dès que le compte-rendu est validé.



**Sensibiliser le clinicien à ces délais «incompressibles»**

## 6. Techniques de biologie moléculaire

---

La recherche des principales mutations actionnables peut se faire par **plusieurs techniques en biologie moléculaire** (séquençage ciblé, PCR en temps réel pour la détection de mutations...).

Elles permettent de déterminer rapidement le statut d'un seul gène généralement (EGFR)

► **Le séquençage nouvelle génération (NGS) :**

- actuellement, la plupart des centres utilisent le NGS après amplification ou capture des exons hotspots de mutations des gènes à analyser (EGFR, KRAS, ALK, BRAF, HER2, MET...) selon une liste minimale définie par l'INCa.

- le NGS permet la détermination des mutations ponctuelles, insertions-délétions, anomalies du nombre de copies (amplification de MET ...).

L'utilisation de panels plus larges ou le séquençage d'exome (partie codante du génome) permet l'étude d'autres cibles et éventuellement le calcul de la charge mutationnelle. Ils sont réservés à des patients entrant dans des protocoles de recherche et doivent être prescrits en RCP.

► **Technique d'hybridation in situ fluorescente (FISH) :**

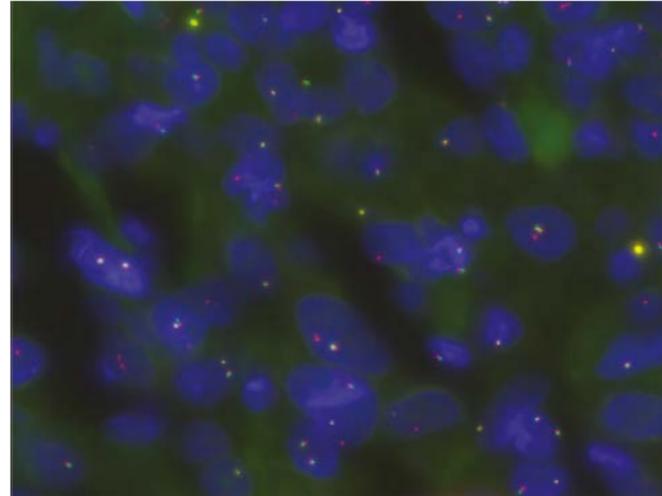
• **La détection de réarrangements**

**chromosomiques** impliquant les gènes ALK et ROS1 se fait généralement après immunohistochimie.

En cas de positivité, elle est réalisée par FISH avec des sondes encadrant le point de cassure, ce qui permet de démontrer que l'anomalie est portée par les cellules tumorales au-dessus d'un seuil spécifique.

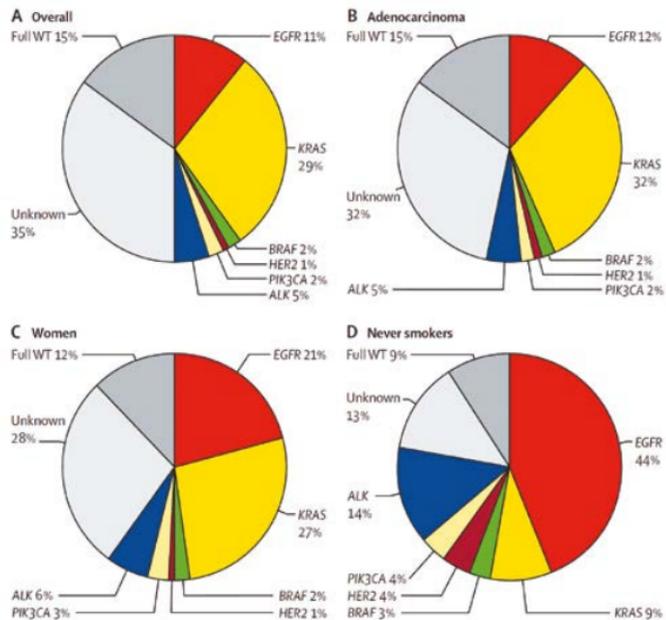
• **La détection des transcrits de fusion** issus de ces réarrangements est désormais possible par NGS mais nécessite une extraction spécifique d'ARN supplémentaire. Elle a été validée pour les pièces opératoires et **son application à des petits prélèvements dépend de la quantité de matériel initial** (nombre de biopsies en zone tumorale) et restant après la réalisation des autres techniques [12]. C'est pourquoi l'immunohistochimie (suffisante pour la prescription d'inhibiteurs de ALK en cas de signal 3+) et la FISH sont encore utilisées et adaptées à l'étude des petits prélèvements.

**Présence d'un réarrangement de ALK démontré par FISH**

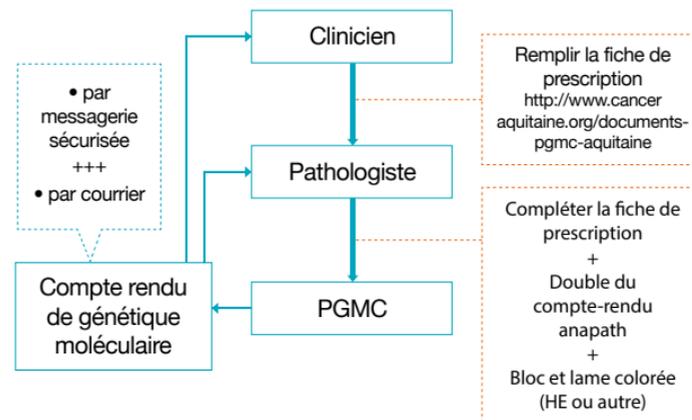


*(Cliché issu de la collection personnelle du Pr Jean-Philippe Merlio, CHU de Bordeaux)*

## Fréquence des altérations génétiques [13]



## Procédure de demande d'analyse moléculaire à la Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers (PGMC) de Bordeaux



Facturation à l'établissement du prescripteur prenant en charge le patient

(Instruction DGOS/PF4/DSS/1A/2018/101 du 16/04/2018)

# Notes



Notes area with 10 horizontal dotted lines for writing.

Notes area with 10 horizontal dotted lines for writing.

# Notes



A series of ten horizontal dotted orange lines, spaced evenly down the page, providing a template for handwritten notes.

A series of ten horizontal dotted orange lines, spaced evenly down the page, providing a template for handwritten notes.

# Notes



Notes area with 10 horizontal dotted lines for writing.

Notes area with 10 horizontal dotted lines for writing.

# Bibliographie

---

[1] Guvenc, C., Yserbyt, J., Testelmans, et al. (2015). Computed tomography characteristics predictive for radial EBUS-miniprobe-guided diagnosis of pulmonary lesions. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(3), 472-478.

[2] Choi, S. E., Hong, S. W., & Yoon, S. O. (2015). Proposal of an appropriate decalcification method of bone marrow biopsy specimens in the era of expanding genetic molecular study. *Journal of pathology and translational medicine*, 49(3), 236.

[3] Miquelestorena-Standley, E., De Pinieux, G., Galant, C., et al. (Juin 2016) Différents protocoles de décalcification - Impacts sur les techniques d'analyse complémentaires - «Guidelines»- Atelier médico-technique. *Bulletin de la Division Française de l'AIP n°63* - p. 155-160.

[4] MacGrogan, G., Mathieu, M. C., Poulet, B., et al. (2014, October). Pre-analytical stage for biomarker assessment in breast cancer: 2014 update of the GEFPICS' guidelines in France. In *Annales de pathologie* (Vol. 34, No. 5, pp. 366-372).

[5] Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., et al. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1240-1242.

[6] Lantuejoul, S., Rouquette, I., Brambilla, E., et al. (2016, January). Nouvelle classification OMS 2015 des adénocarcinomes pulmonaires et prénéoplasies. In *Annales de Pathologie* (Vol. 36, No. 1, pp. 5-14). Elsevier Masson.

[7] Adam J, Le Stang N, Rouquette I et al. Multicenter French harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018

[8] Tsao, M. S., Kerr, K. M., Dacic, S. A. N. J. A., et al. (2017). IASLC atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer. Aurora, CO: International Association for the Study of Lung Cancer.

[9] Lantuejoul, S., Adam, J., Girard, N., et al. (2018, April). Tests immunohistochimiques PD-L1 dans les cancers du poumon non à petites cellules: recommandations par le groupe PATTERN de pathologistes thoraciques. In *Annales de Pathologie* (Vol. 38, No. 2, pp. 110-125). Elsevier Masson.

[10] Antoine, M., Chenard, M. P., Piton, N., et al. Recommandations SFP-AFAQAP pour le testing ALK dans les CBNPC-mai 2017. *Société Française de Pathologie* 2017.

[11] Antoine, M., Chenard, M. P., Penault-Llorca, F, et al. Recommandations SFP-AFAQAP pour le testing ROS1 dans les CBNPC en ACP-août 2018. *Société Française de Pathologie* 2017.

[12] Vendrell, J. A., Taviaux, S., Béganton, B., et al. (2017). Detection of known and novel ALK fusion transcripts in lung cancer patients using next-generation sequencing approaches. *Scientific reports*, 7(1), 12510. 2;7(1):12510.

[13] Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J. P., et al. (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *The Lancet*, 387(10026), 1415-1426.

## Mentions légales

---

Graphisme : Agence COSMO - [www.agencecosmo.com](http://www.agencecosmo.com)

Photographies des pages 23, 27, 45 : Laure Bousseaud, dans le cadre du projet de BRIO (Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie) « Ce fragment de nous qui reste à l'hôpital » réalisé avec le collectif ASPERON & CO  
Plus d'informations sur <http://siric-brio.com>

Impression : Imprimerie Laplante - 3 Impasse Jules Hetzel, 33700 Mérignac

Réalisé avec le soutien de



Le groupe de travail remercie **Hélène REINOLD**, responsable régionale médecine personnalisée, Roche SAS, pour son implication dans ce projet.

