

PILOTE

LES BIOMARQUEURS PRÉDICTIONNELS À L'ÈRE DE L'IMMUNOTHÉRAPIE

LA PHASE PRÉ-ANALYTIQUE

La phase pré-analytique **commence à la résection du prélèvement tumoral et se termine par le montage des lames qui serviront à l'analyse** (coloration, IHC,...). Les différentes étapes de cette phase peuvent impacter l'expression de biomarqueurs évalués par IHC, comme **PD-L1**. Des recommandations, permettant de minimiser ces impacts, ont été publiées. ^[1-3]

1.

PRÉLÈVEMENT & ACHÈMINEMENT

Délai d'ischémie froide • Idéalement inférieur à 30 min

Taille de l'échantillon • Surface $\geq 3 \text{ mm}^2$ et longueur $\leq 3-5 \text{ mm}^2$

2.

FIXATION & IMPRÉGNATION EN PARAFFINE

Type de fixateur • Formol Neutre Tamponné à 10 %, pH 7,0-7,4, à température ambiante

Temps de fixation • 6 h à 48 h (biopsies) ou 24 h à 72 h (résections)

Température de la paraffine • $\leq 60^\circ\text{C}$

3.

COUPE & MONTAGE

Épaisseur des coupes • 3-5 μm

Respect de la température • $\leq 60^\circ\text{C}$

4.

CONSERVATION

Blocs de paraffine • 3 ans maximum

Lames « blanches » • 2 mois maximum entre 2 et 8°C



1. PRÉLÈVEMENT & ACHEMINEMENT [1-8]

1.

Le prélèvement doit être suffisamment volumineux pour contenir un minimum de 100 cellules tumorales. Sa nature (biopsie, pièce opératoire ou cytologique) et sa taille vont influencer les étapes qui suivront, notamment la qualité de la fixation et de l'analyse.



Prendre note de l'heure de prélèvement permet de contrôler les durées d'ischémie froide et de fixation. Les prélèvements doivent être déposés rapidement dans le fixateur, dès le bloc opératoire lorsque possible, notamment pour les biopsies, afin de stopper l'effet de l'ischémie froide.



Les prélèvements cytologiques ne doivent pas être utilisés pour réaliser un test PD-L1 associé au CPS.

- Réaliser des prélèvements représentatifs de la zone tumorale
- Pour préserver les structures, limiter le temps d'ischémie froide correspondant au délai séparant la réalisation du prélèvement et le début de la fixation

IDENTIFICATION DU PRÉLÈVEMENT

- Type de demande d'examen
- Identité du patient
- Contexte clinique

TEMPS D'ISCHÉMIE FROIDE

- Optimal < 30 min
- Ne doit pas excéder 1 heure

TAILLE DE L'ÉCHANTILLON

- Surface minimum $\geq 0,3 \text{ mm}^2$
- Longueur maximum $\leq 3 - 5 \text{ mm}$

2.

2. FIXATION & IMPRÉGNATION EN PARAFFINE [1,2,6,8-12]

La fixation est une étape décisive puisqu'elle stabilise les structures cellulaires et les interactions moléculaires de manière irréversible dans un état proche de l'état physiologique. Une mauvaise fixation ne pourra pas être corrigée. Le standard à utiliser est le Formol Neutre Tamponné 10 % (NBF 10 %).

Le fixateur doit diffuser jusqu'au centre de l'échantillon.

Le nettoyage des excédents de fixateur limite le risque de sur-fixation et permet de maximiser l'accès des anticorps à leur épitope.



Le passage du NBF 10 % à l'alcool doit être réalisé dans une fenêtre de temps contrôlée. Pendant l'imprégnation, réaliser au moins deux bains de paraffine pure, sans traces de xylène.

- Arrêter les processus de dégradation cellulaire et stabiliser les interactions moléculaires
- Remplacer le fixateur par de la paraffine pour donner une structure solide à l'échantillon permettant de le couper

FIXATION DES ÉCHANTILLONS

- Utiliser des réactifs récents
- Volume de fixateur $\geq 4-10$ fois le volume de l'échantillon
- Biopsie : 6 à 48 heures / Résection : 24 à 72 heures
- pH = 7,0-7,4
- Température ambiante
- Décalfication : si nécessaire, privilégier un agent faiblement acide tel que l'EDTA

IMPÉGNATION & INCLUSION

- La température de la paraffine ne doit pas dépasser 60°C

3.

3. COUPE & MONTAGE [1,6,8,13]

Ces étapes sont essentielles pour réaliser des marquages homogènes, reproductibles et fiables.



Il est préconisé de réaliser les coupes peu de temps avant l'IHC, avec une lame de coupe neuve, de placer les blocs de paraffine à basse température avant la coupe et de monter les lames avec de l'eau seule. L'épaisseur et la régularité des coupes au microtome doivent être contrôlées régulièrement.

- Réaliser des coupes permettant de conserver suffisamment de matériel (épaisseur) afin de visualiser les structures d'intérêt au microscope et d'évaluer correctement les niveaux d'expression protéique

MODALITÉS DE COUPE & MONTAGE

- Épaisseur optimale des coupes 3-5 μm (épaisseur d'une cellule)
- Respect de la température ($\leq 60^\circ\text{C}$) et de la durée du séchage
- Contrôle régulier de l'ensemble des outils

- Préserver les échantillons de la dégradation



Les échantillons tissulaires non utilisés doivent être préférentiellement stockés en bloc de paraffine. Ces blocs ou les lames blanches non colorées doivent être conservés à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité pour éviter le séchage et la photo-oxydation responsables de la perte d'antigénicité.



Le stockage en rubans doit être évité.

BLOCS

- 3 ans au maximum

LAMES «BLANCHES»

- 2 mois au maximum
- De 2°C à 8°C

CPS : *Combined Positive Score* ; EDTA : acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique ; IHC : ImmunoHistoChimie ; NBF : *Neutral Buffered Formalin* (formol neutre tamponné) ; PD-L1 : *Programmed Death-Ligand 1*.

1. Lantuejoul S *et al.* Tests immunohistochimiques PD-L1 dans les cancers du poumon non à petites cellules : recommandations par le groupe PATTERN de pathologistes thoraciques. *Ann Pathol.* 2018;38(2): 110-25. **2.** Comité consultatif en anatomopathologie. Guide sur l'assurance qualité en anatomopathologie. Phases pré-analytique et analytique. 2011. **3.** INCa. Cancer bronchique non à petites cellules, référentiel national de RCP, mars 2015. **4.** Institut national d'excellence en santé et en services sociaux. Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules. 2017. **5.** Référentiels AURA en oncologie thoracique. Cancer bronchique non à petites cellules. 16^e édition. Mise à jour 2020. **6.** Dako, IHC Guidebook Sixth Edition. 2013. **7.** Groupement des hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille. Manuel de prélèvement du Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques. 2015. **8.** International Association for the Study of Lung Cancer. IASLC Atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer. 2017. **9.** Dako Agilent Pathology Solutions. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual. 2017. **10.** VENTANA. VENTANA PD-L1 (SP263) Assay Staining of Non-Small Cell Lung Cancer Interpretation Guide. 2016. **11.** Compton CC *et al.* Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. *Arch Pathol Lab Med.* 2019;143(11):1346-63. **12.** Cree IA *et al.* PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology.* 2016;69(2):177-86. **13.** Canene-Adams K. Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for immunohistochemistry. *Methods Enzymol.* 2013;533:225-33. **14.** Engel KB et Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin- embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(5):537-43.