

Biomarqueurs en cancérologie : attentes et perspectives

Quelles types de réponses peuvent
apporter les centres de ressources
biologiques ? (CRB) ?

Frédérique Penault-Llorca

Centre Jean Perrin

Clermont-Ferrand



15 & 16 DÉCEMBRE

Biomarqueurs en cancérologie : attentes et perspectives

Quelles types de réponses peuvent apporter
les centres de ressources biologiques ? (CRB) ?
Frédérique Penault-Llorca, Centre Jean Perrin, France

■ Types de prélèvements

- taille des prélèvements nécessaires
- lames déparaffinées versus biopsies congelées
- tumeur primitive versus métastase
- importance des prélèvements sanguins

■ Délais

- d'identification
- d'acheminement
- d'analyse

■ Exigences et limites d'un CRB

- **propriété**
- accès aux annotations cliniques
- partage des prélèvements entre diagnostic, prospective et recherche

Centres de ressources biologiques. Définition des Centres de ressources biologiques établie par l'OCDE :

- *Les centres de ressources biologiques (CRB) se composent de prestataires de services et de centres de conservation de cellules vivantes, de génomes d'organismes, et d'informations sur l'hérédité et les fonctions des systèmes biologiques.*
- *Les CRB détiennent des **collections d'organismes cultivables** (micro-organismes, cellules végétales, animales et humaines, par exemple), des parties répliquables de ces organismes (par exemple, génomes, plasmides, virus, ADNc), des organismes viables mais pas encore cultivables, des cellules et des tissus ainsi que **des bases de données** contenant des informations moléculaires, physiologiques et structurelles sur ces collections, et la bio-informatique qui leur est associée.*

CRB

- Plate-forme technologique de soutien à la recherche clinique sous formes de bibliothèques +/- spécialisées, labellisées par le Ministère de la Santé et le Ministère de la Recherche.
- Le CRB est une structure à la disposition des chercheurs pour la constitution de collections biologiques et la mise à disposition d'échantillons dans le cadre de la recherche.

Réglementation

- Charte éthique pour le recueil, la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux humains dans le cadre de la prise en charge médicale et de la recherche en cancérologie, Recommandations à l'égard du praticien, du chercheur et des responsables de tumorothèques et de centre de ressources biologiques, éd. INCA, nov. 2006.

CRB

- Collections de tumeurs à visée sanitaire
- Collections de tumeurs à visée de recherche
- Serothèque, biothèque au sens large
- Matériel frais congelé ou matériel fixés en paraffine

Prélèvements

■ Tumorothèque paraffine

- Contrainte : doit être gardée **10 ans** et 15 de plus pour les enfants et les lames 30 ans
- Les blocs appartiennent aux patients
- Problèmes
 - ▶ coût inhérent au désarchivage du bloc de paraffine (30€ non pris en charge par la nomenclature)
 - ▶ Délai de 10 ans court pour la recherche

Cibles en routine

Facteurs prédictifs pour orienter la thérapeutique:

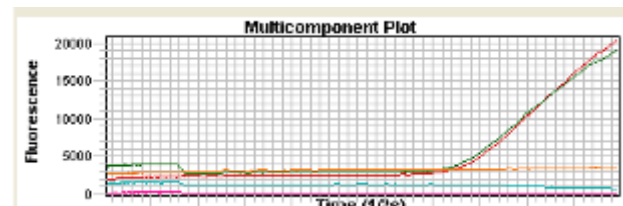
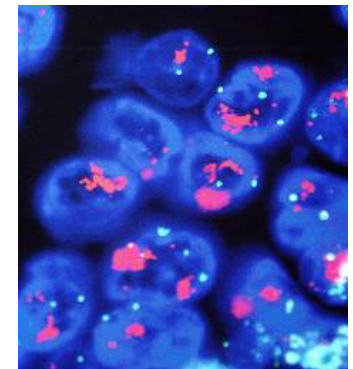
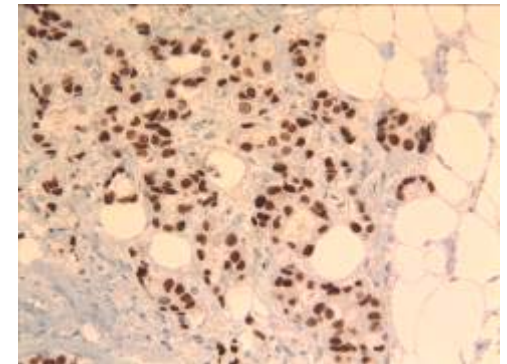
Réceptivité hormonale

Statut HER2

C-KIT

KRAS

Mutation EGFR



La plupart de ces recherches se font sur blocs de paraffine

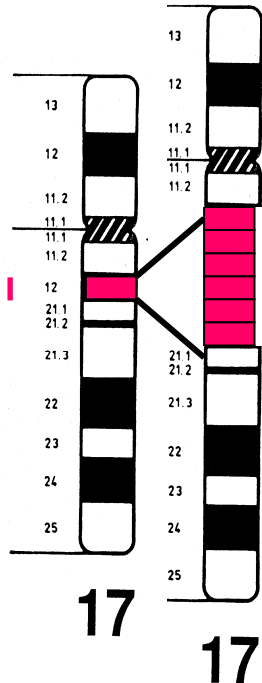
- Importance majeure de la qualité du prélèvement étudié
 - Qualité de la fixation (rapidité, type de fixateur, contraintes législatives pour le formol)
 - Cellularité du prélèvement (pb des prélèvements post thérapeutiques, biopsies pulmonaires etc...)
- Changement des pratiques biopsiques ? (poumon)

Situation en 2009-20010

- Cibles thérapeutiques « de routine »
 - RE, RP, HER2 (faits systématiquement, autoprescription des tests par les pathologistes),
 - ▶ techniques immunohistochimiques +/- hybridation *in situ*
 - ▶ *Sur bloc de paraffine ayant servi au diagnostic*
 - ▶ *Cotation P200 pour IHC (quelque soit le nbre de tests) et P500 pour ISH (quelque soit le nombre de sondes utilisées)*
 - Kit pour GIST (tumeurs stromales gastro-intestinales)
 - ▶ IHC (c-kit, +/- CD34 etc...)
 - ▶ Genotypage (mutations)
 - Tumeurs pulmonaires (ADK surtout mais pas seulement) mutations EGFR

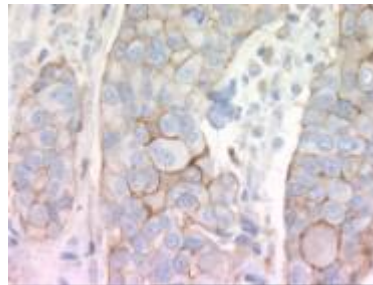
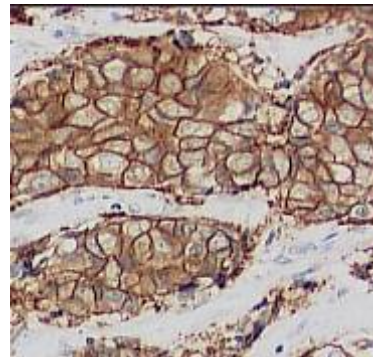
HER2

ELIGIBILITE AU TRAITEMENT

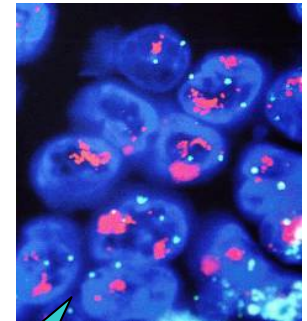


17q12-21 →
HER-2

IHC



FISH



SISH



Amplification du gène

Surexpression de la protéine

Amplification du gène

Circuit du prélèvement

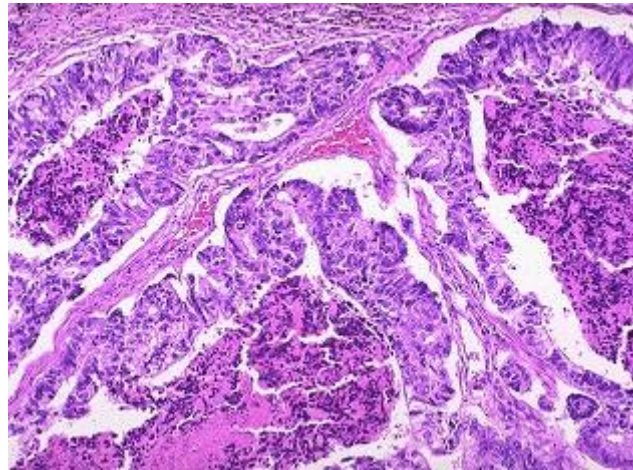
KRAS

Le pathologiste joue un rôle clé

- Intervient dans les conditions de fixation du prélèvement qui doivent être optimales
- Intervient dans le conditionnement du prélèvement pour le génotypage



Intervention chirurgicale



Tumeur fixée et incluse en paraffine



Extraction d'ADN et recherche de mutations de K-Ras

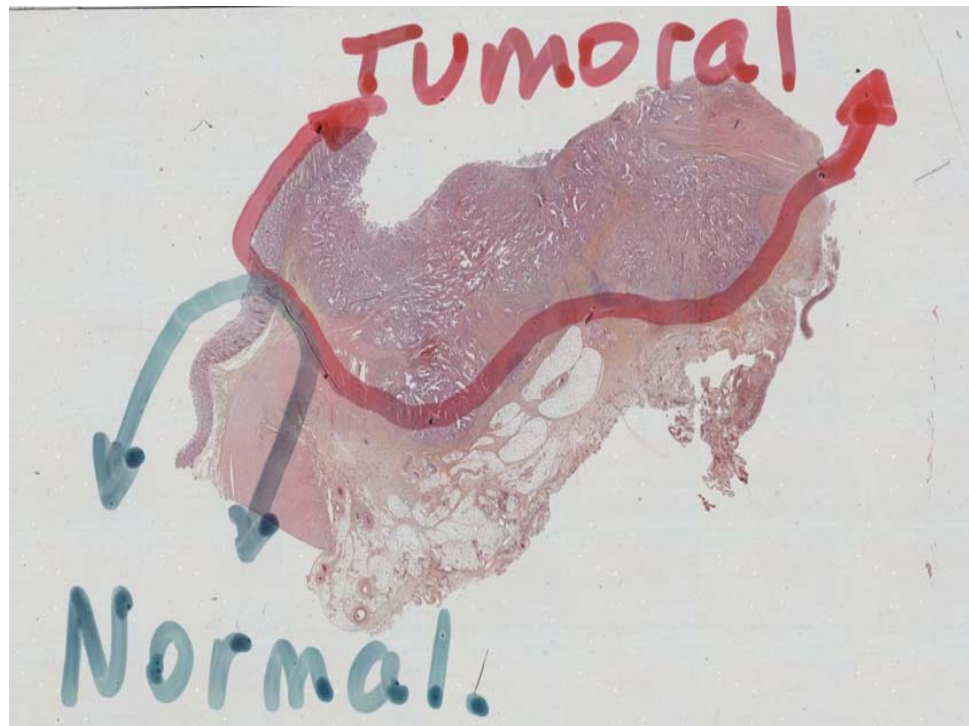
Bloc fixé et inclus en paraffine

K-Ras
et techniques
anatomopathologiques

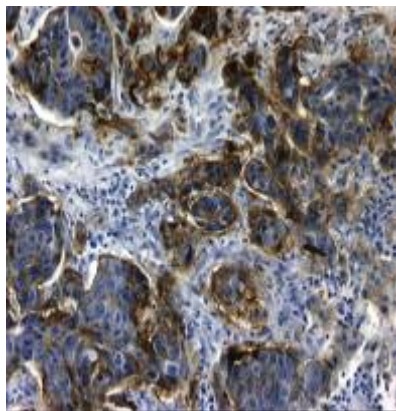
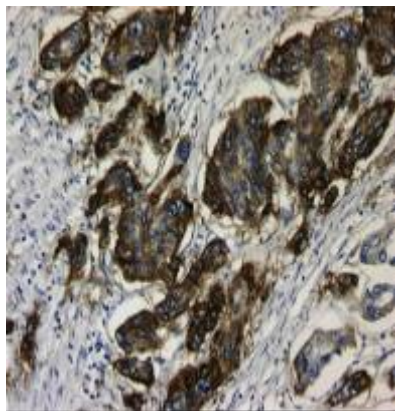
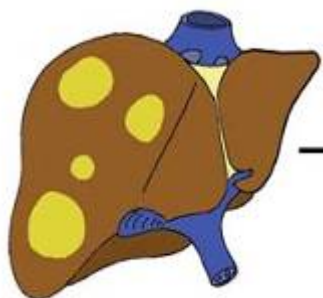
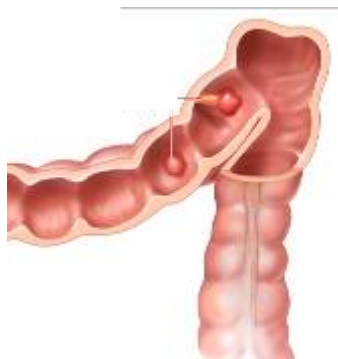
Sélection



Macrodissection



Correlation tumeur-metastases



Statut EGFR sur coupes tissulaires

Cas N°	Primitif	Métastases synchrones (site N°)				Métastases métachrones (site N°)				
		1	2	3	4	1	2	3	4	5
1	+	+	+	+	+					
2	+	+	+	+						
3	+	+	+	+						
4	+	+	+			+	+	+	+	+
5	+	+	+							
6	+	+	+							
7	+	+	+			-				
8	+	+	+							
9	-	+	-							
10	+	+				+				
11	+	+				+				
12	+	+								
13	+	+								
14	+	+								
15	+	+								
16	+	+								
17	+	+								
18	+	+								
19	+	+								
20	+	+								
21	+	+								
22	+	+								
23	+	+								
24	+	+								
25	+	+								
26	+	+								
27	+	-								
28	+	-								
29	-	+								
30	-	+								
31	-	+								
32	-	+								

Concordance
25/32 cases (78%)

Discordance
7/32 ($p= 0.453$)

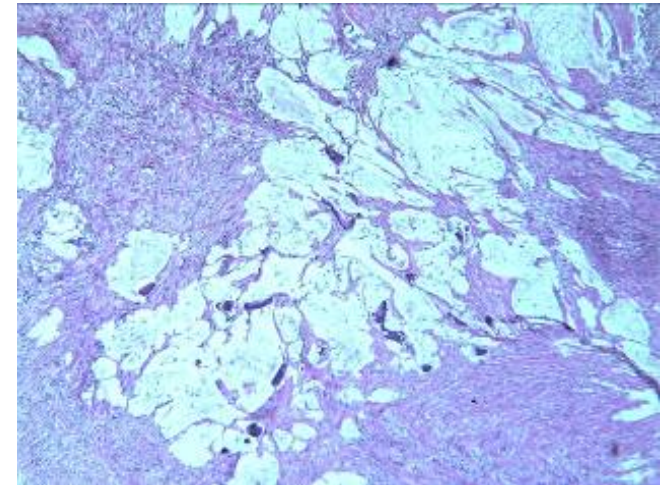
À ne pas sélectionner

K-Ras
et techniques
anatomopathologiques

**Pas de tissus fixes au bouin
extraction acides nucleiques
impossible**



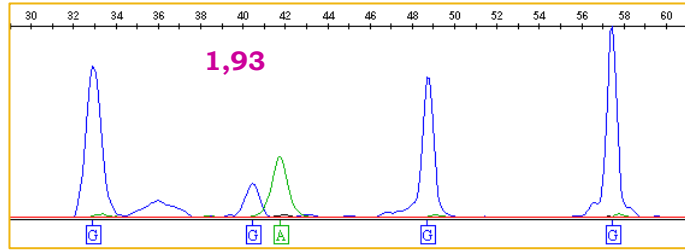
**un prélèvement peu représentatif
et/ou pas assez cellulaire**



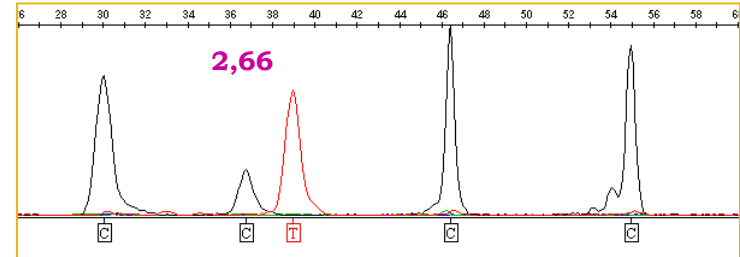
Un pourcentage d'au moins 50% de cellules tumorales est souhaitable.
En deçà, le résultat ne sera validé qu'en cas de mutation de K-Ras avérée (pour éviter de rendre des résultats faux négatifs par sous représentation tumorale).

Mutation c.35G>A, G12D

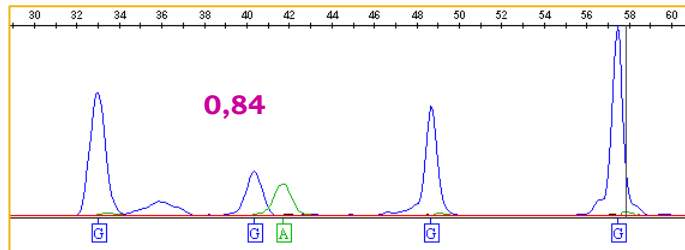
JC SABOURIN



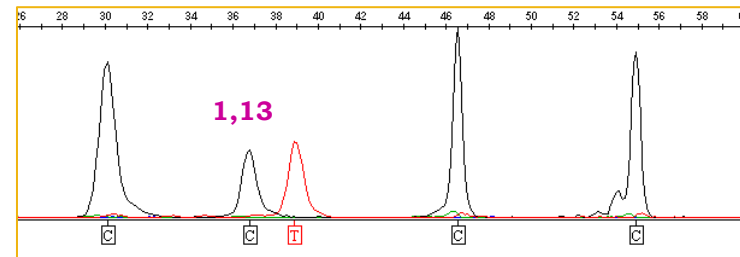
100 %



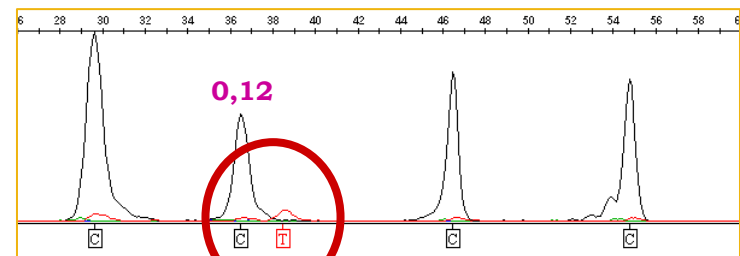
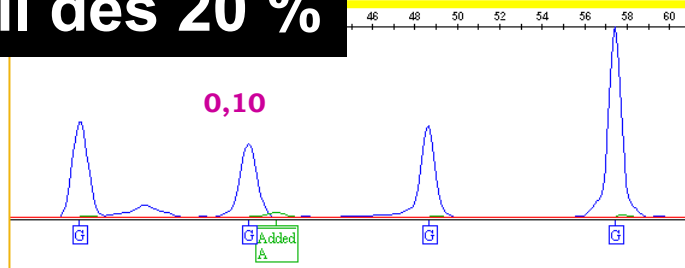
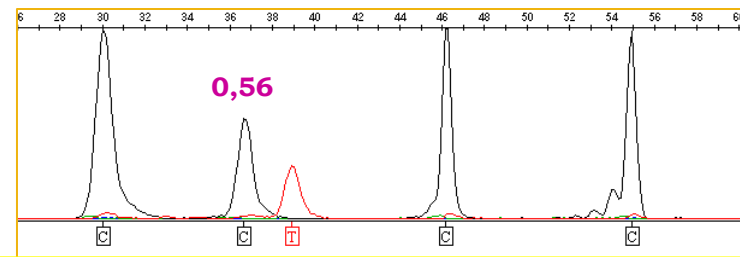
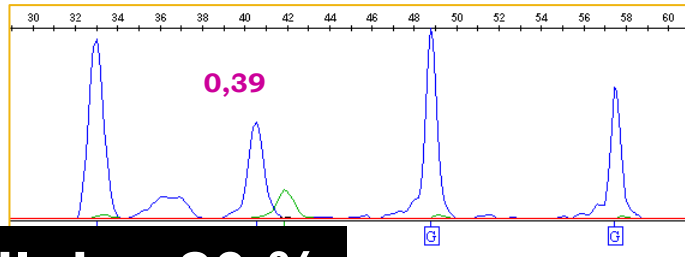
50 %



25 %



5 %



Seuil des 20 %

À sélectionner

K-Ras
et techniques
anatomopathologiques

Bloc de tumeur fixée
en afa ou formol



Bloc de métastase volumineux



Éventuellement macrodisséquer

Lors d'une demande de recherche du statut K-Ras suite

K-Ras
et techniques
anatomopathologiques

■ Deux options sont possibles

- Soit l'envoi du bloc sélectionné directement au centre effectuant le génotypage
- Soit préparation de trois à cinq copeaux de 10 microns (éventuellement après macrodissection du bloc pour éliminer les zones non tumorales) à déposer dans des tubes « nalgène » et à acheminer rapidement au centre responsable du génotypage



Attention aux lames blanches
Risque d'altération des protéines
Difficulté à sélectionner les bonnes zones

- **Zone tumorale repérée sur la lame HES**
- **Évaluation approximative du pourcentage de cellules tumorales**
- **Éventuellement “macro dissection” sur le bloc paraffine de la zone tumorale à couper au microtome.**

Macrodissection

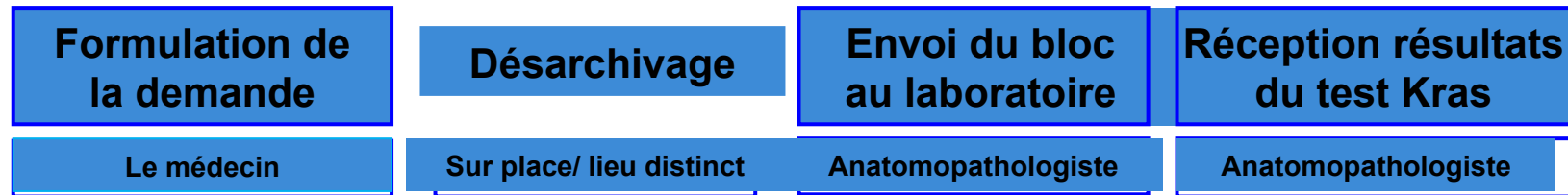
K-Ras
et techniques
anatomopathologiques



- **Réception avec la fiche de demande**
- **Vérification de la concordance des numéros d'identification (bloc reçu et compte rendu transmis + courrier)**
- **Contrôle histopathologique pour évaluer la cellularité**
- **Conditionnement du prélèvement pour le génotypage.**

Le délai moyen entre la demande de réalisation du test *KRAS* et la réception des résultats est en moyenne de 20 jours

Résultats : enquête effectuée auprès de 100 pathologistes



4 jours
(n= 606)



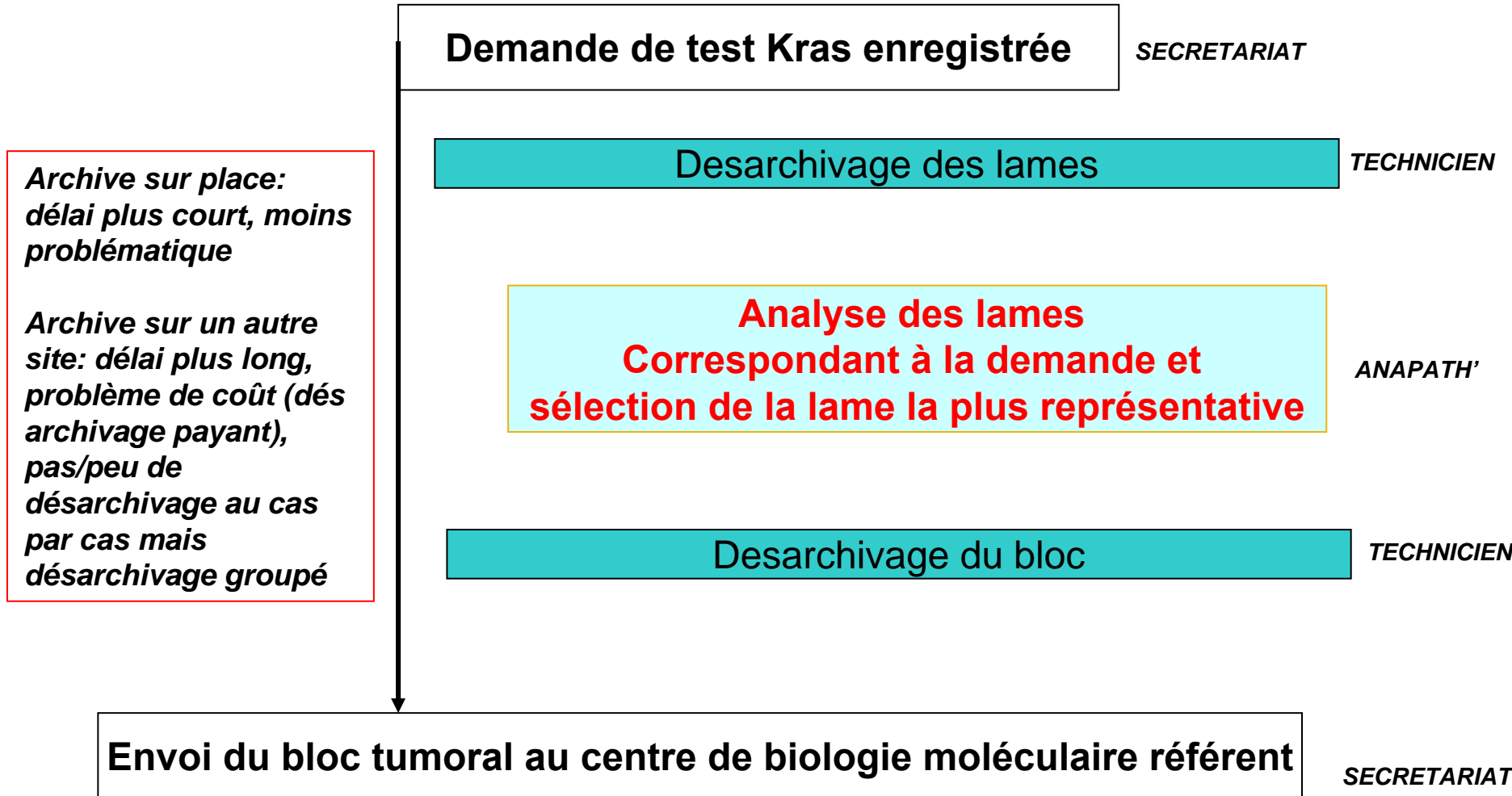
2 jours
(n= 592)



14 jours
(n= 383)



Réalisation du désarchivage



Flux et délais

Gastro-entérologue / Oncologue

CAC/hôpital
en interne

Libéraux avec
Archive sur
place

Libéraux sans
Archive sur
place

>> Formule la demande ----- J 0
 >> Envoie la demande

Anatomo-pathologiste

>> Réceptionne et enregistre la demande ----- J + 1
 >> Désarchive les lames
 >> Analyse les lames, choisit le bloc ----- J + 3
 >> Désarchive le bloc sélectionné ----- J + 3
 >> Réalise les coupes/ lames
 >> Envoie la demande ----- J + 2
----- J + 6
----- J + 10

Laboratoire de Biologie Moléculaire référent

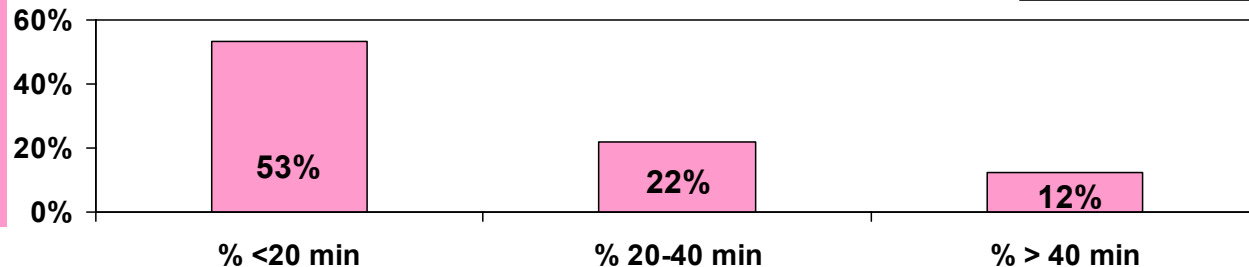
>> Réceptionne et enregistre la demande ----- J + 4
 >> PCR ----- J + 10/15
 >> Enregistre et renvoie résultats ----- J + 9
----- J + 28

Combien de temps estimez-vous avoir passé environ, au sein de votre structure, sur le traitement de cette demande ?

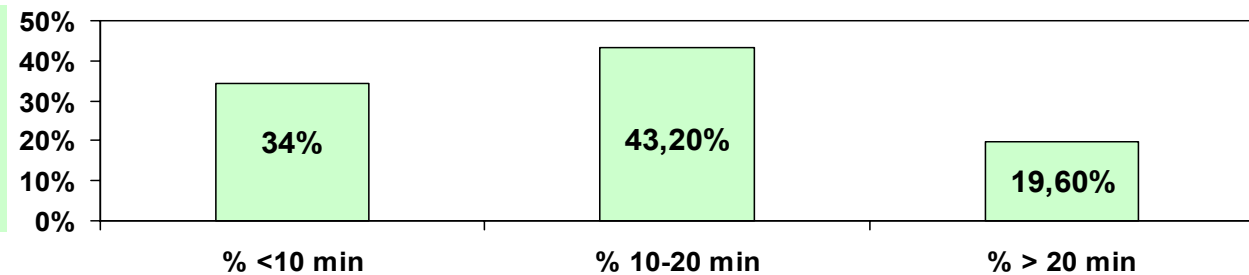
n = 563 à 624



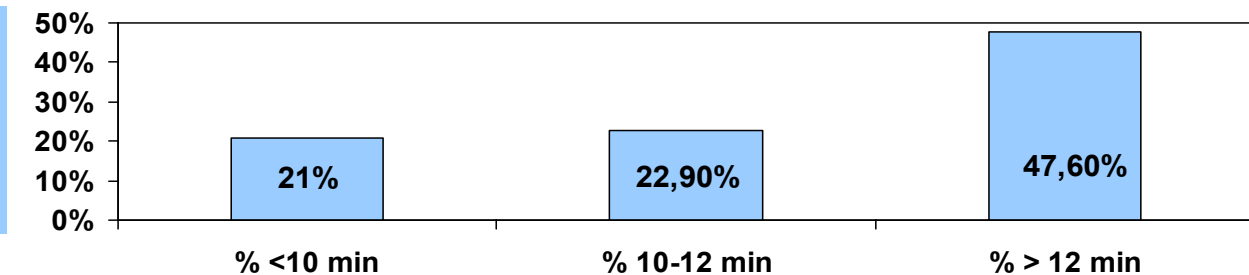
Technicienne
21 min en moyenne




Secrétaire
12 min en moyenne

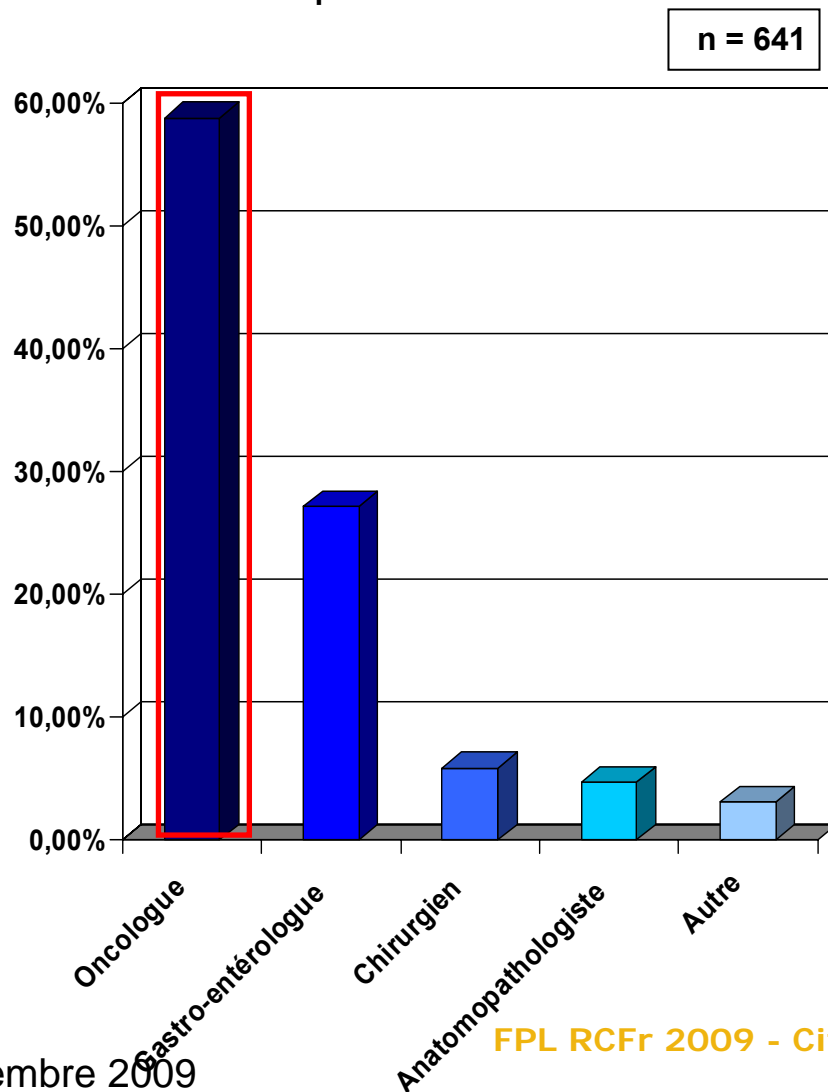



Anatomopathologiste
14 min en moyenne



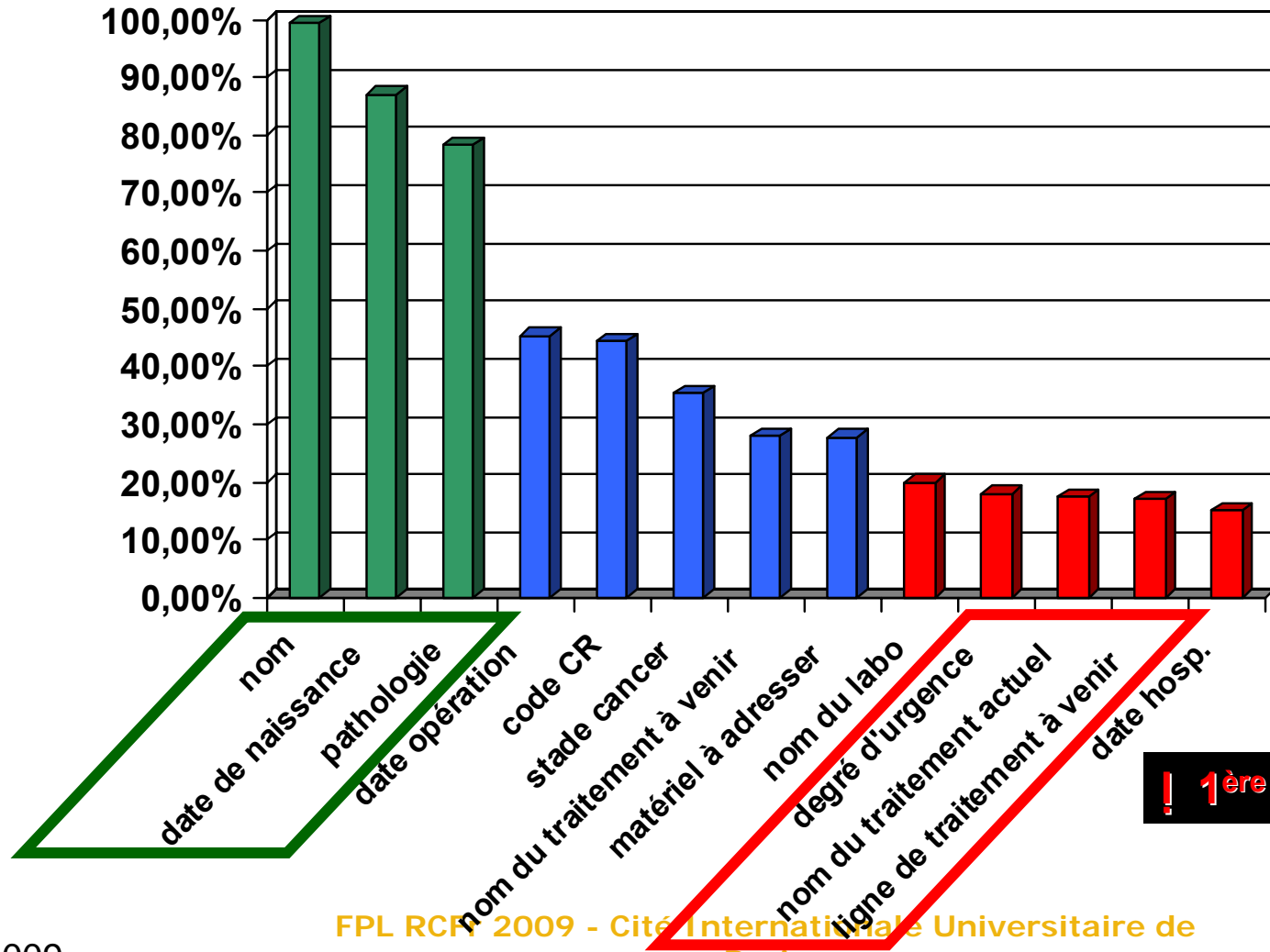
Médecins Prescripteurs

Demande formulée par :



- Les oncologues et les gastro-entérologues semblent les plus à mêmes à prescrire ce test dans le but de choisir un traitement
- Le pathologiste n'est généralement pas à l'origine des demandes de génotypage *Kras* : avenir ?

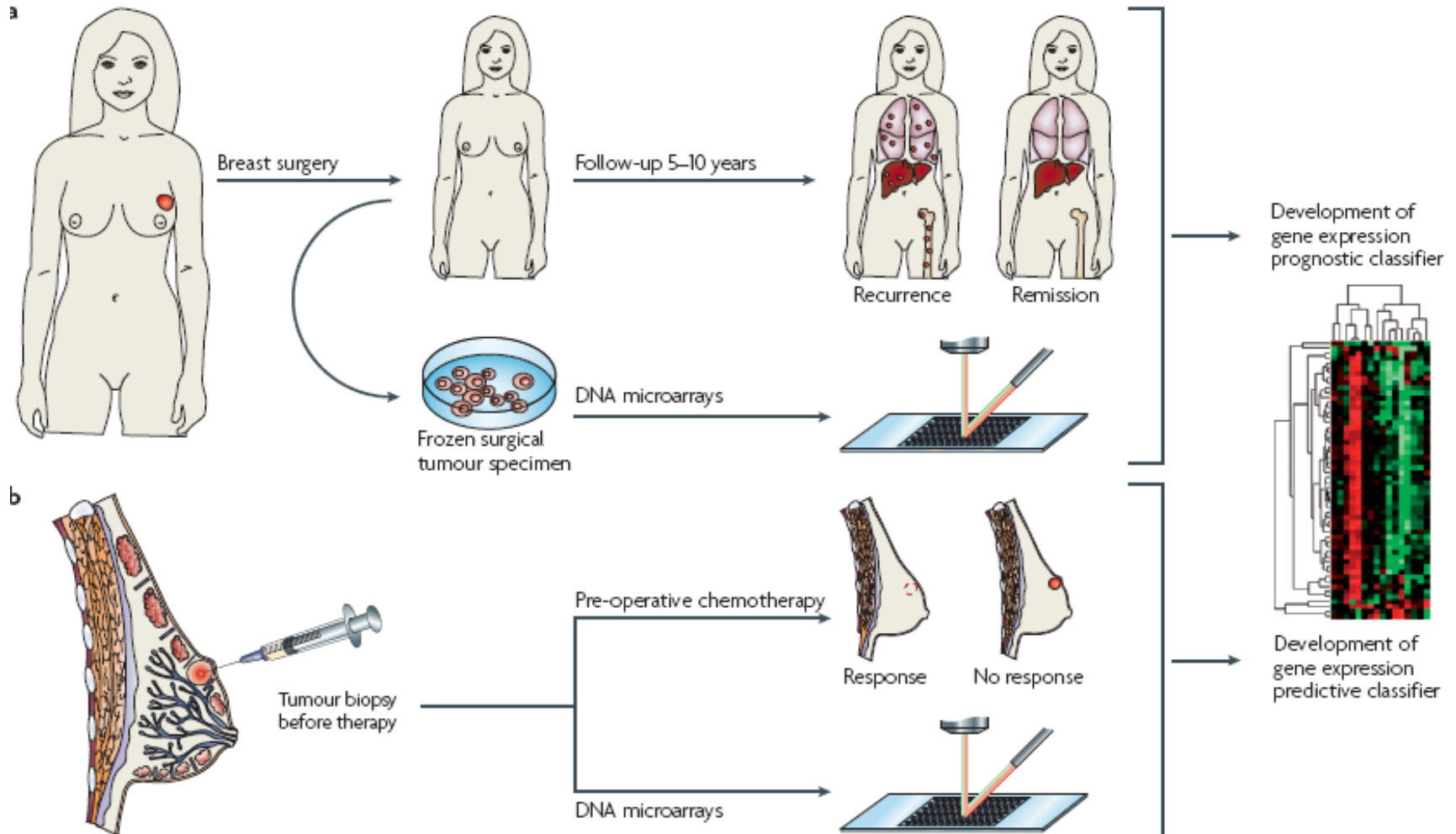
Le nom du patient, sa date de naissance et sa pathologie sont les principaux éléments renseignés lors de la demande



! 1^{ère} ligne

n = 629

Outils technologiques : puces à ADN

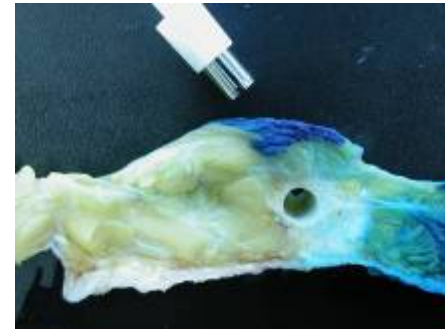


Puces à ADN

FPL RCFr 2009 - Cité Internationale Universitaire de Paris

Procédures pour certains kits

- Les biopsies doivent être prélevées, une heure au max après la chirurgie (20 min optimal)
- Mise en azote immédiate ou bien préservation dans un liquide préservant les ARN (RNARetain, fournie avec le kit MammaPrint, RNA later)

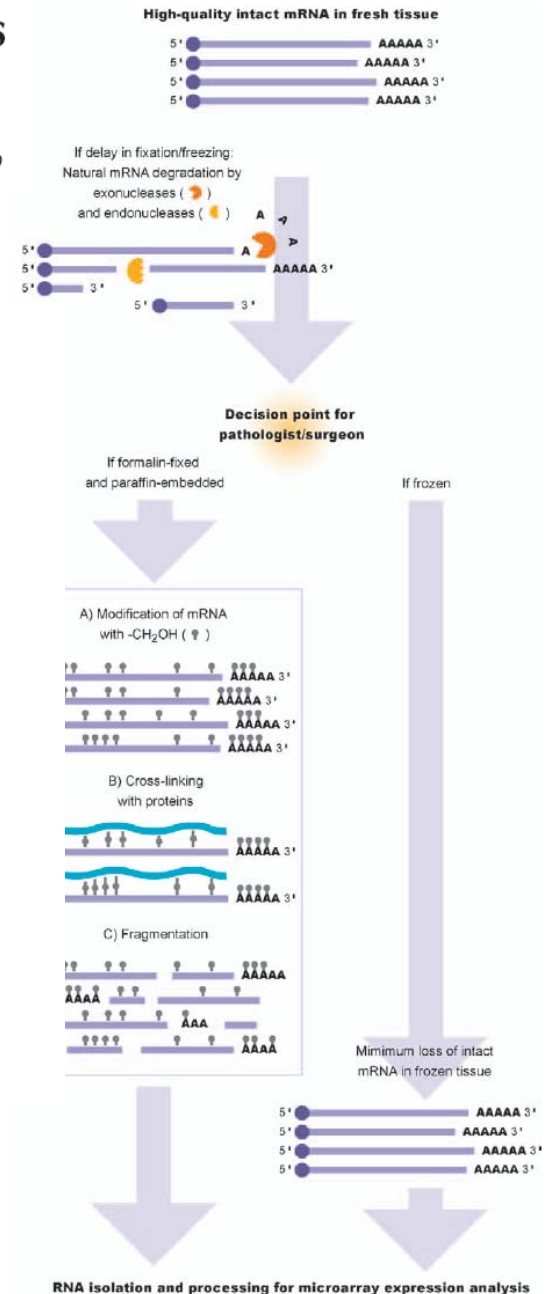
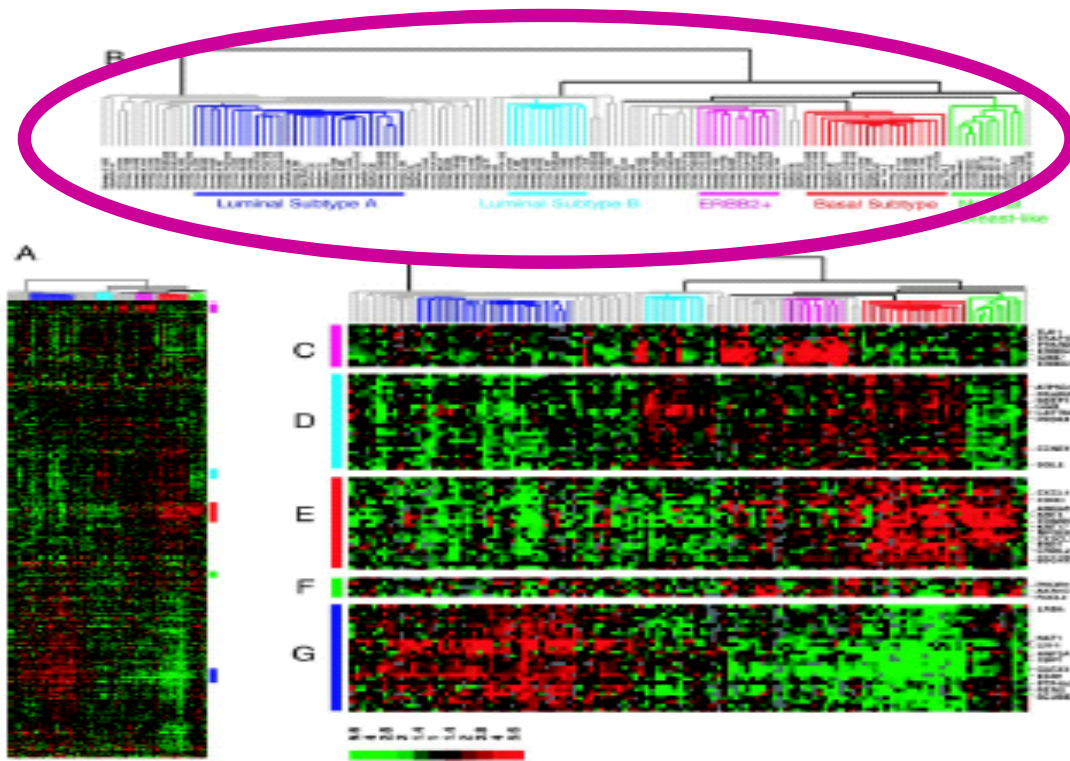


Tissue Handling for Genome-Wide Expression Analysis

A Review of the Issues, Evidence, and Opportunities

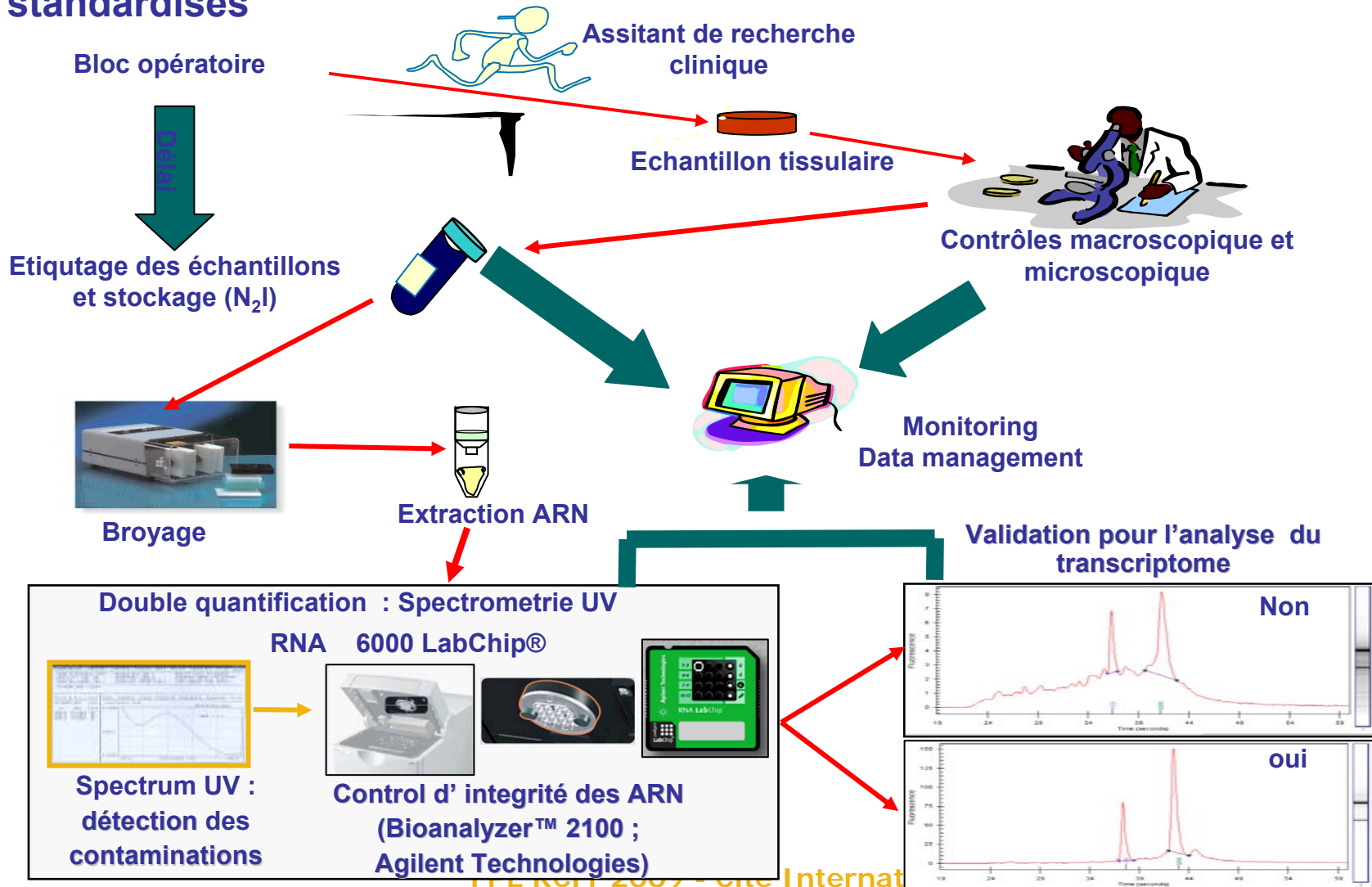
Fabiola Medeiros, MD; C. Ted Rigel, PhD; Glenda G. Anderson, MBA; Shawn H. Becker, MD; Kevin C. Halling, MD, PhD

(Arch Pathol Lab Med. 2007;131:1805-1816)



La quête de la qualité

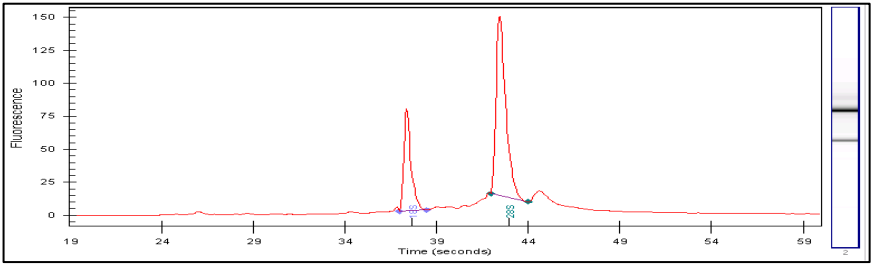
Organisation complexe, multidisciplinarité, procédures et protocoles standardisés



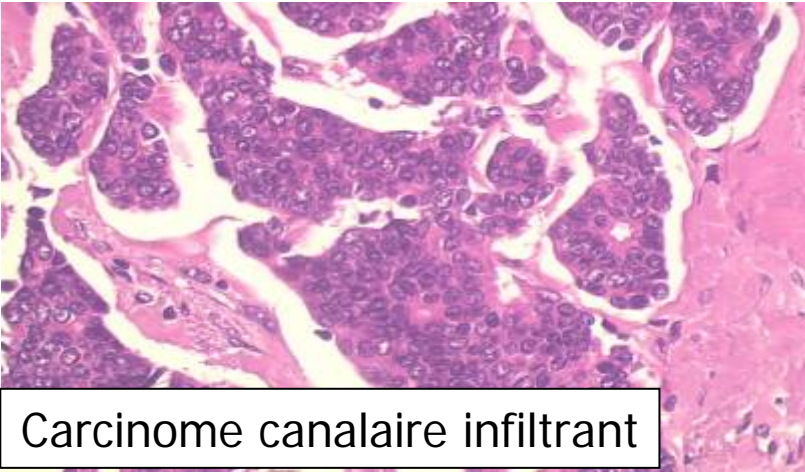
Rapidité de la fixation



Tumeur du sein



Procédure rapide = qualité ARN



Carcinome canalaire infiltrant

CARCINOME CANALAIRE IN SITU (CCIS) sans lésion infiltrante associée non

Taille du plus grand foyer sur lame: mm

Si coupes sériées: Nombre de blocs avec CCIS: Distance entre la première et la dernière tranches avec CCIS: mm

Type: comédo massif tubiforme papillaire micropapillaire crémipon

Grade nucléaire: 1 2 3 Proportion de noyaux de grade 3: %

Nécrose: non oui focale extensive

Grade CCIS: bas intermédiaire haut

Foyer du mamelon

MICROINVASION (remplir le paragraphe concernant le carcinome canalaire in situ) non

Quelques cellules infiltrantes (type 1) Quelques fots infiltrants (type 2) Nombre de foyers microinfiltrants:

Taille du plus grand foyer: mm non évaluable

CARCINOME(S) INFILTRANT(S) (CI) non

Unique multiples (séparées par du tissu sans CCIS ni CI remplissant le type des autres foyers au stad. extension) non évaluable

Taille (oyer principal infiltrant): mm Taille globale (CI + CCIS): mm non évaluable

Type: canalaire lobulaire autre, préciser:

Différenciation: 1 2 3 Noyaux: 1 2 3 Mitoses: 1 2 3 nombre de mitoses/mm²:

Grade Elston & Ellis: I II III

Emboles périluminaux: non vus présents

CCIS associé: non % bas intermédiaire haut

CLIS associé: non oui

TISSUE-ARRAY: LE PRINCIPE

50-500 spots par lame...

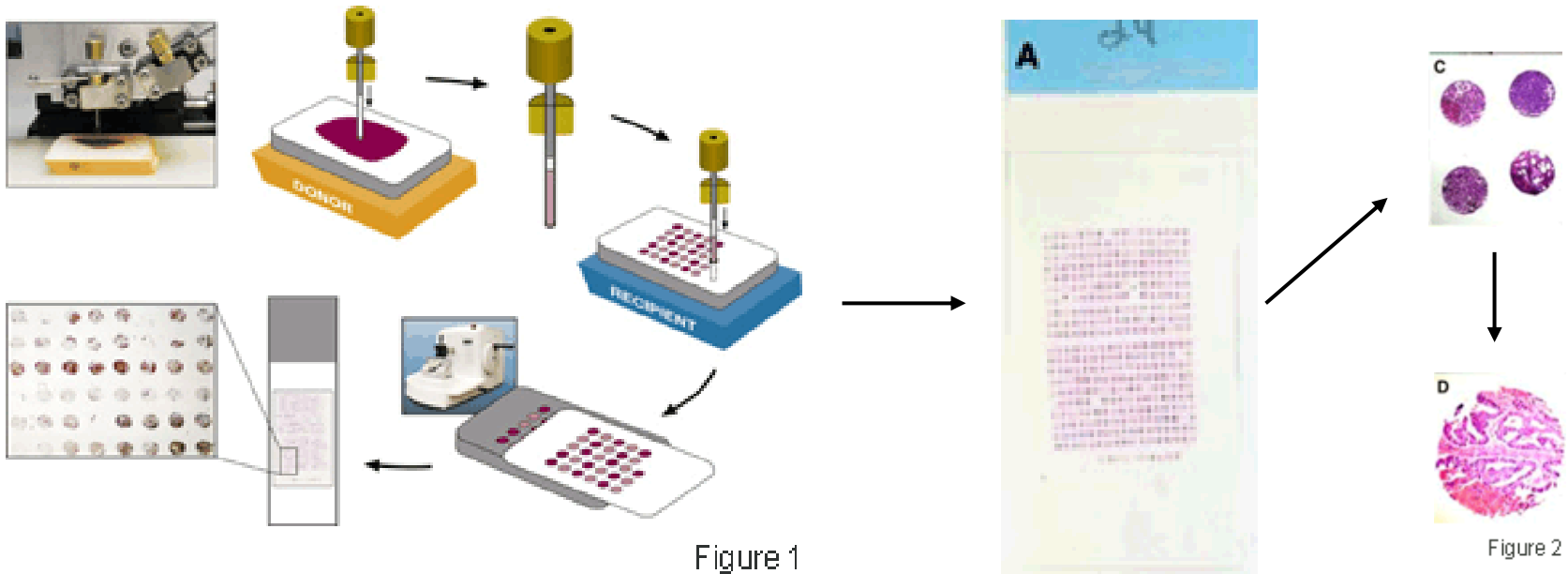


Figure 1

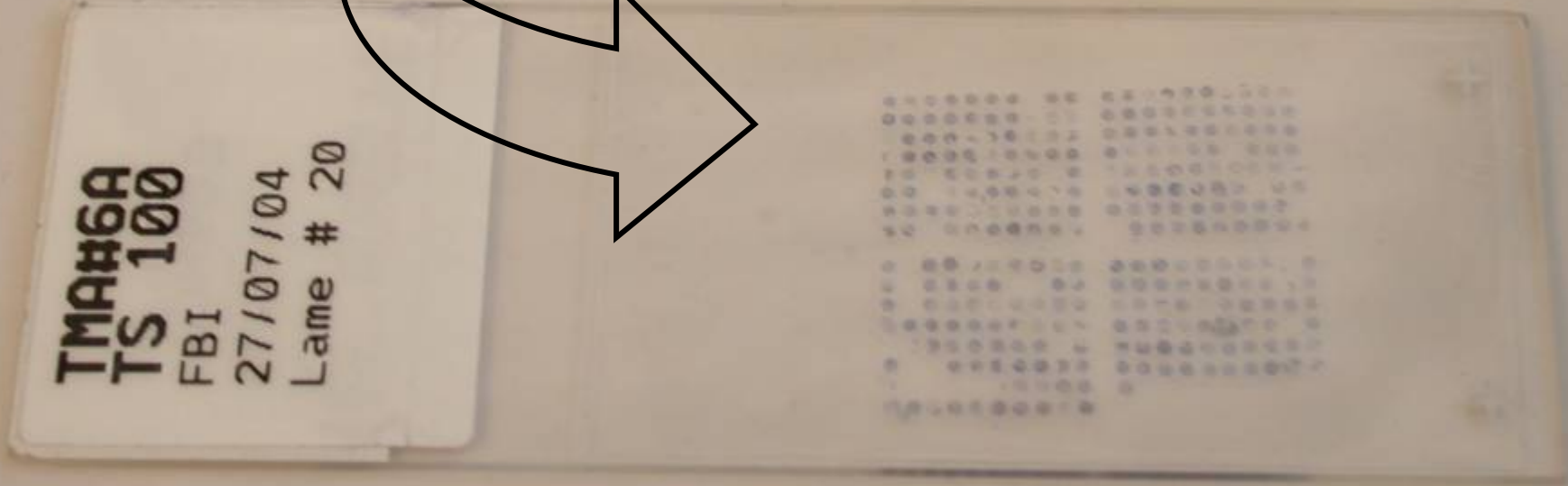
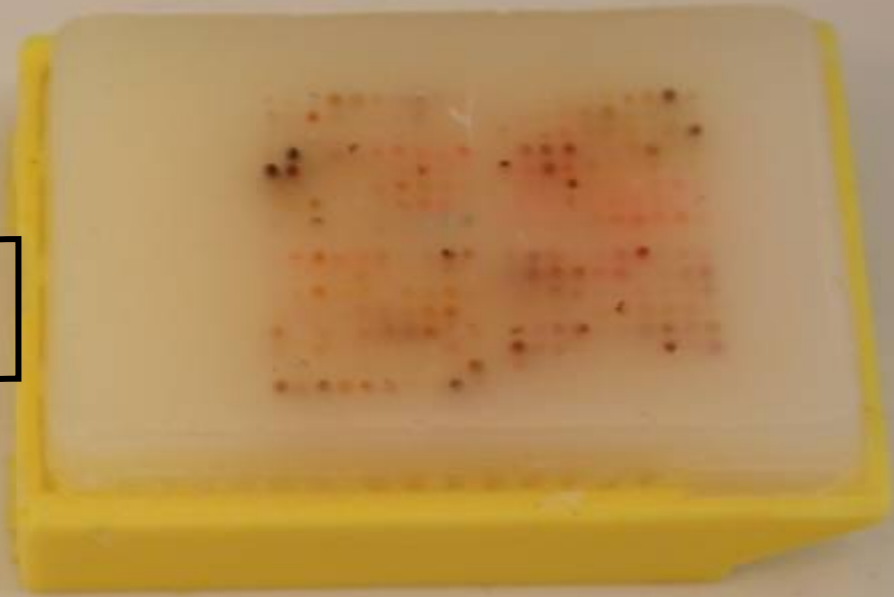
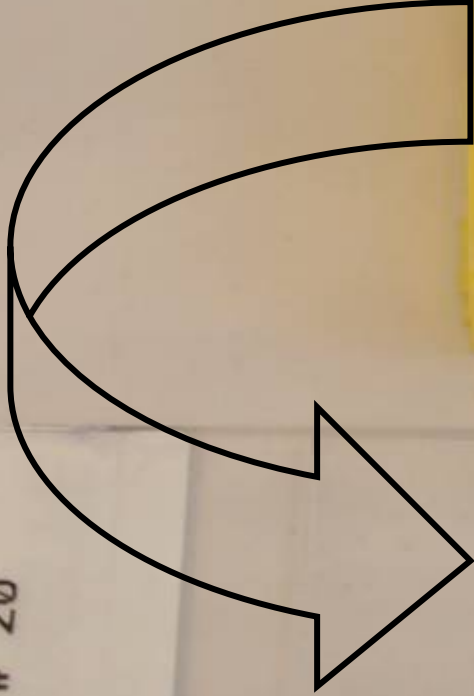
Figure 2

TMA#6A
TS 100

FBI

27/07/04

Lame # 20



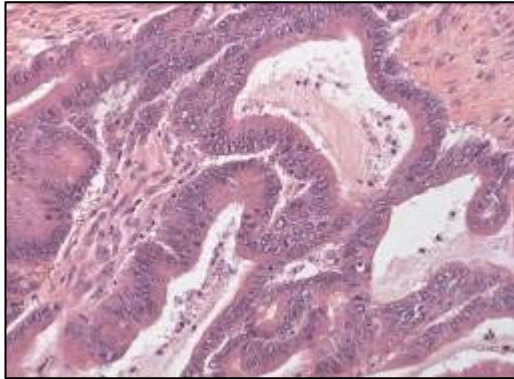


NOUVELLES METHODES DE PRÉSERVATION TISSULAIRE

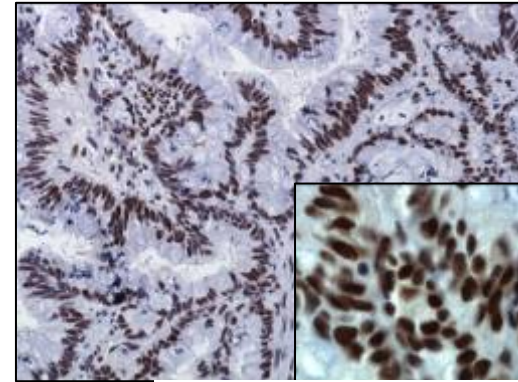
Un compromis entre la congélation et le formol

LES NOUVEAUX FIXATEURS: CANCER COLIQUE

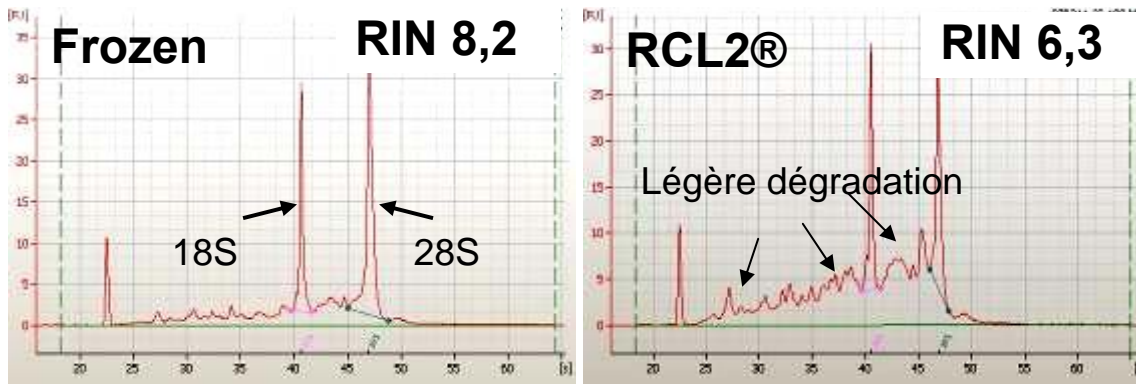
MORPHOLOGIE



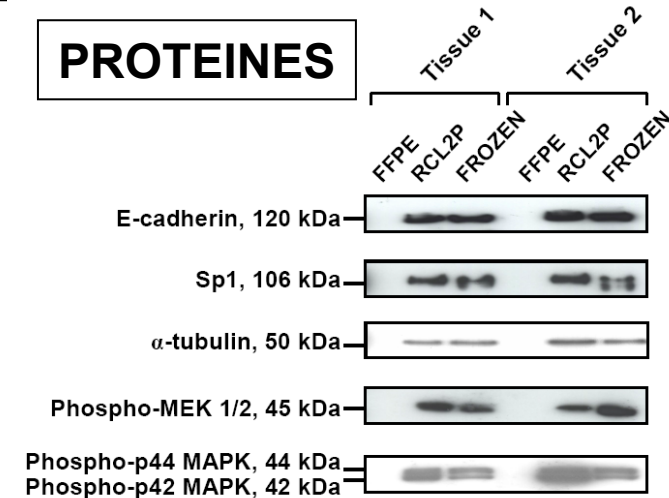
IHC (ex: hMLH1)



ARN



PROTEINES



Prélèvements sanguins

- Génotypage (gènes de susceptibilité, polymorphismes génétiques)
- Dosage de PK
- Dosage activité enzymatiques (toxicité au 5-FU)
- Stockés sous forme de sérum (sérothèque) ou extraction ADN/ARN/PROT

Contraintes des CRB

- Il est préalablement rappelé que les activités de conservation et de préparation à des fins scientifiques des éléments du corps humain, ce qui inclut la constitution et l'utilisation de collections d'échantillons biologiques humains, **doivent être déclarées** avant leur mise en œuvre par les organismes assurant ces activités pour les besoins de leurs propres programmes de recherche.

Charte CRB - ARTICLE 1 :

- Lorsqu'un prélèvement tumoral humain (tissus, cellules, sang), prélevé dans le cadre des soins, est conservé à des fins de recherche biomédicale, **une partie de la tumeur (échantillon tumoral) doit, chaque fois que possible, être réservée au bénéfice individuel du patient.**

ARTICLE 2 :

- L'utilisation des échantillons tumoraux humains à une fin médicale ou scientifique autre que celle pour laquelle ces échantillons ont été prélevés n'est possible que si les deux conditions suivantes sont simultanément réunies :
 - Le patient doit avoir été au préalable dûment informé de cette autre fin
 - Le patient ne doit pas avoir exprimé son opposition.
- Lorsque l'utilisation des échantillons tumoraux est susceptible de comprendre un examen des caractéristiques génétiques constitutionnelles de la personne, le patient doit :
 - Etre dûment informé , préalablement à cet examen, de la nature et de la finalité dudit examen
 - Donner un **consentement exprès**

ARTICLE 3 :

- Les documents relatifs à l'information, à la vérification de l'absence d'opposition ou au consentement du patient doivent être conservés dans son dossier.

ARTICLE 4 :

- Tout utilisation à des fins de recherche, associant des tiers, d'échantillons tumoraux humains collectés dans le cadre d'examens de diagnostic ou de santé doit se faire au travers d'un partenariat incluant l'établissement de soins ou de recherche gestionnaire de ces échantillons. **Le partenariat qui prend la forme d'un contrat précise notamment les objectifs du programme de recherche.** En dehors d'un tel partenariat, toute cession à titre gratuit ou onéreux d'échantillons humains issus de diagnostics ou de soins doit être proscrite. Aucune exclusivité doit être consentie.

Article 4 suite

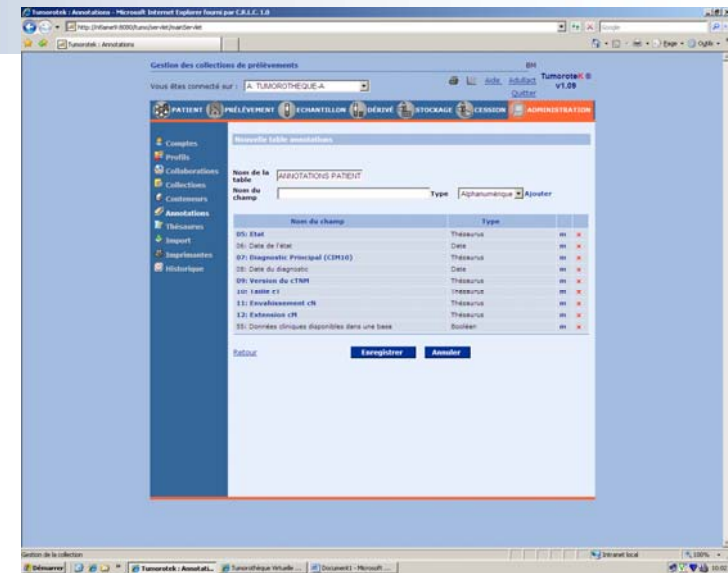
- La mise à disposition d'échantillons tumoraux humains pour la recherche doit se faire, sauf indication exceptionnelle, non pas sous forme native, mais **sous forme de produits dérivés**, en quantités définie, de qualité contrôlée et pour un programme de recherche défini. **Aucune utilisation de reliquat ou des données à caractère personnel liées aux échantillons ne peut être faite pour un autre programme de recherche que celui initialement défini.**
- Un contrat signé des parties structure les relation et énonce les droits et les obligations de chacun des partenaires. Un climat de confiance peut ainsi être établi.

ARTICLE 5 :

- Pour leur utilisation scientifique, les échantillons tumoraux humains peuvent être accompagnés de données directement ou indirectement nominatives traitées par informatique.

• Dans ce cas, des formalités doivent être accomplies auprès de la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL).

Dans le cadre d'un programme partenarial de recherches, le transfert de données directement ou indirectement nominatives devra respecté un formalisme accentué.



CRB

- Conditionnement et stockage des prélèvements pour le diagnostic et la recherche
- Annotations dynamiques
- Une grande partie de la qualité d'un CRB dépend des pathologistes (qualité des prélèvements, rapidité de fixation etc..)

Pathologistes : Contrôle qualité

- Nature de la lésion transmise (bloc)
- Cellularité tumorale
- Extraction des acides nucléiques
- Qualité des acides nucléiques extraits
- Intégration des résultats dans le compte-rendu d'histopathologie
- Double signature : pathologiste-biologiste