

Le pathologiste et les évolutions techniques

Ph. Rochaix

Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole

rochaix.philippe@iuct-oncopole.fr

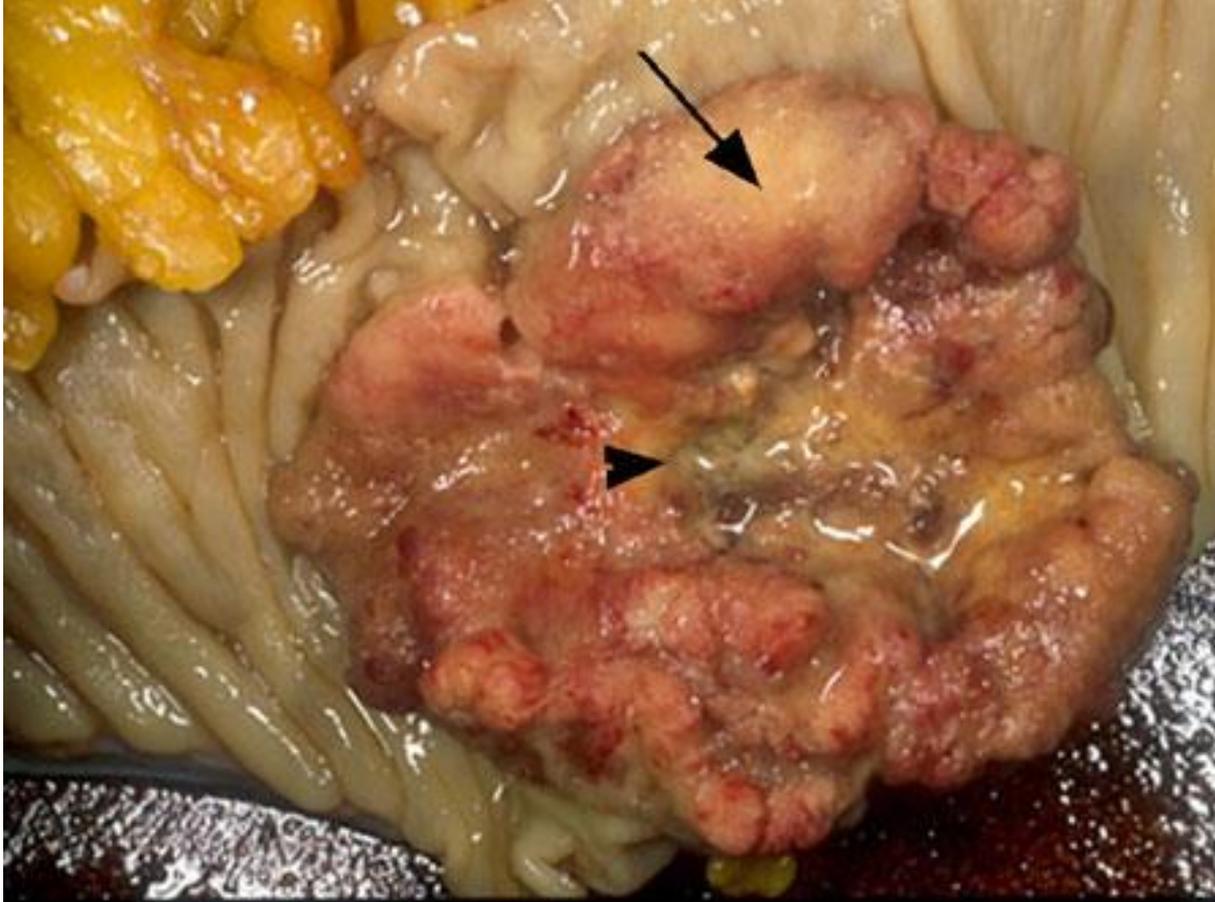
Tél : (33) 5 31 15 64 07

un peu de technique de « base »



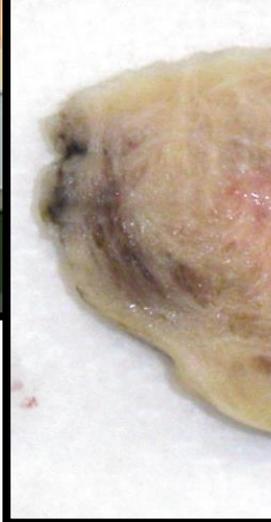
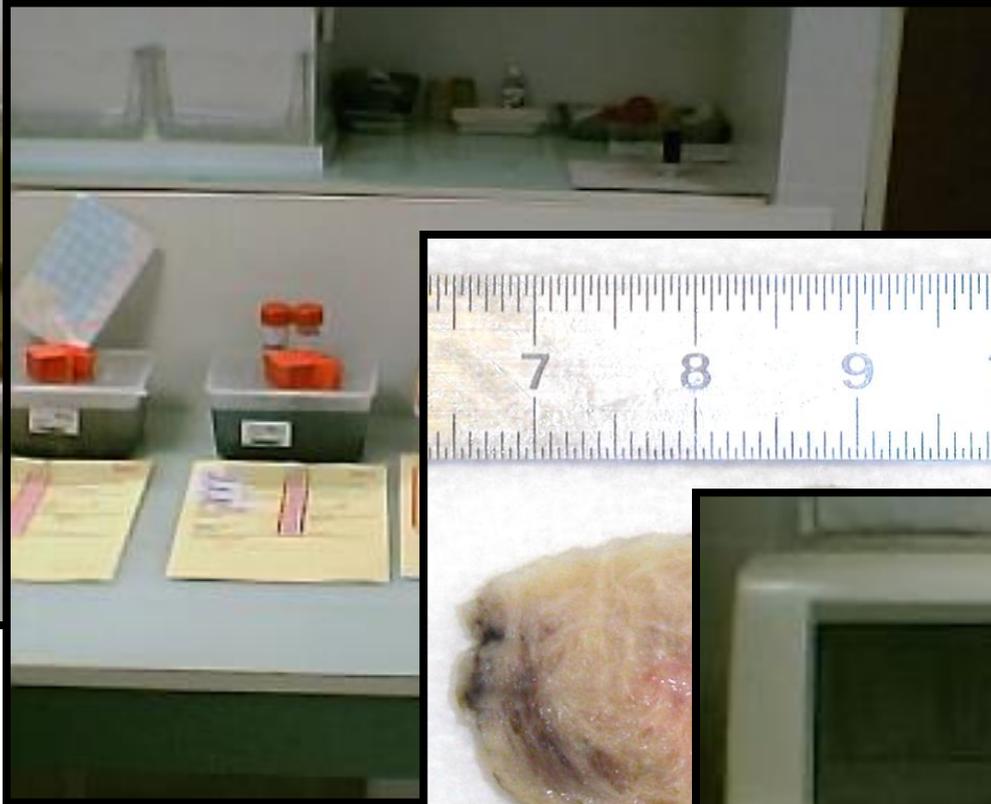


Fixation



Fixation

Fixation





Coupe

Rubans de $5\mu\text{m}$
d'épaisseur

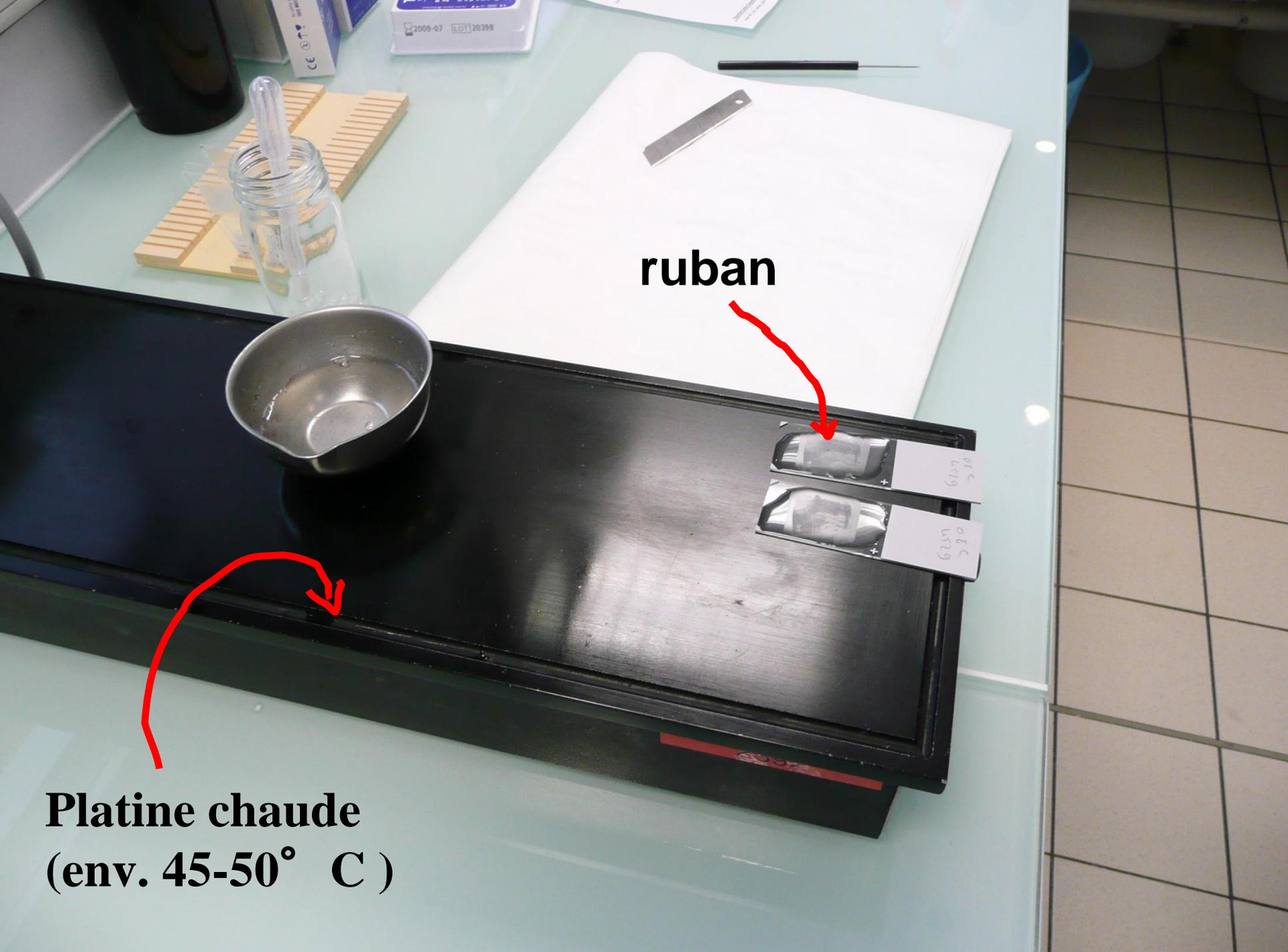




4186 OBC HUM BRASD 01
4186 OBC HUM BRASD 02
4186 OBC HUM BRASD 03
4186 OBC HUM BRASD 04
4185 OBC TMC SD 01
4185 OBC TMC SD 02
4185 OBC TMC SD 03
4187 OBC MER OML 01
4187 OBC MER OML 02
4187 OBC MER OML 03
4181 OBC MER SD 01
4181 OBC MER SD 02
4181 OBC MER SD 03
4181 OBC MER SD 04

ruban

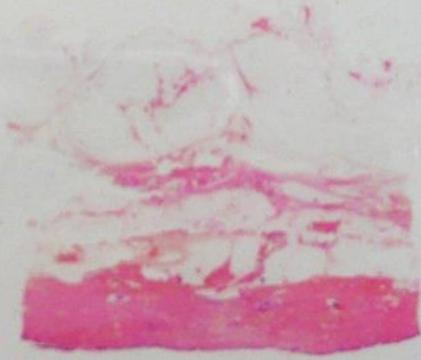
**Platine chaude
(env. 45-50° C)**

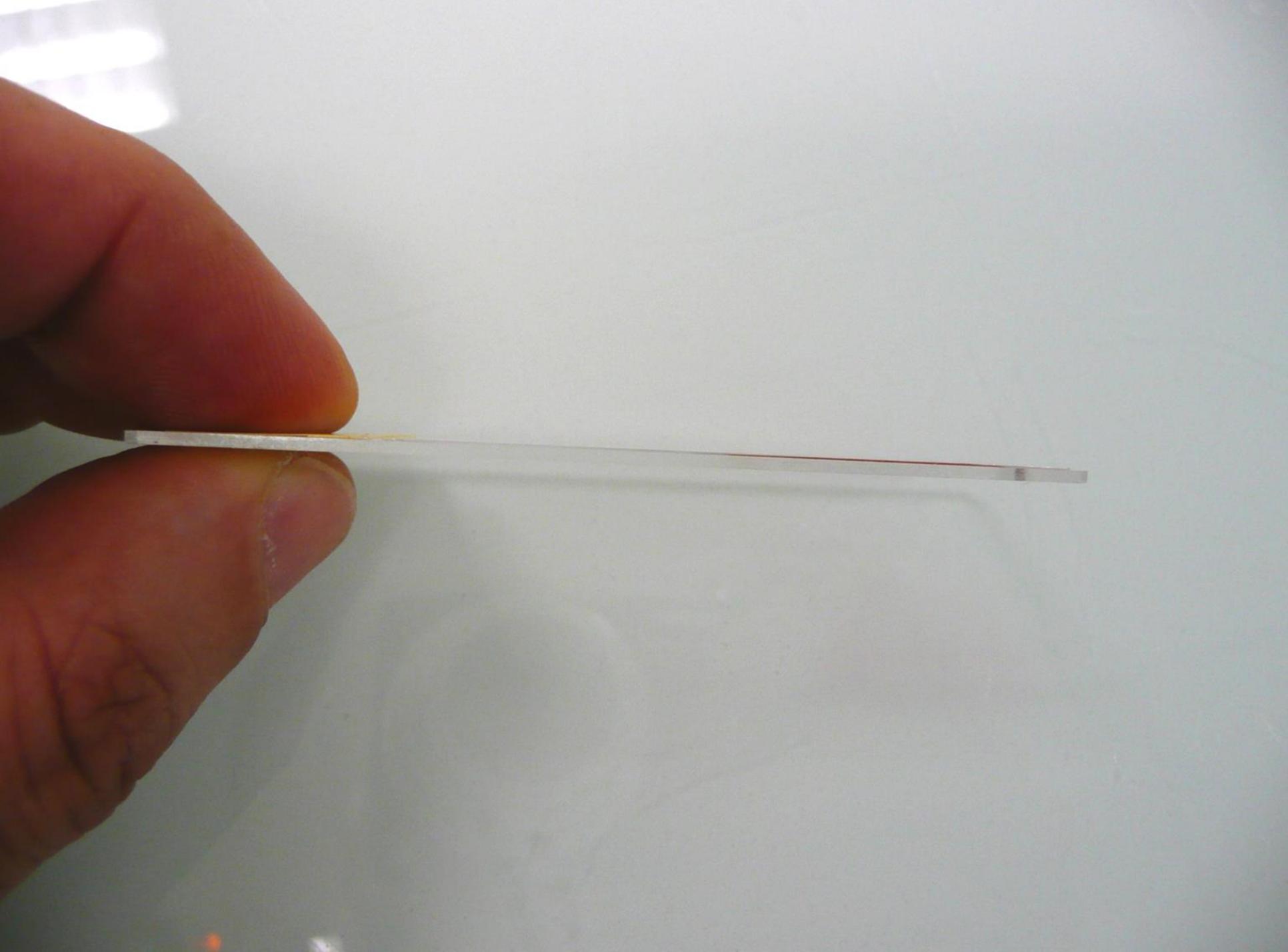


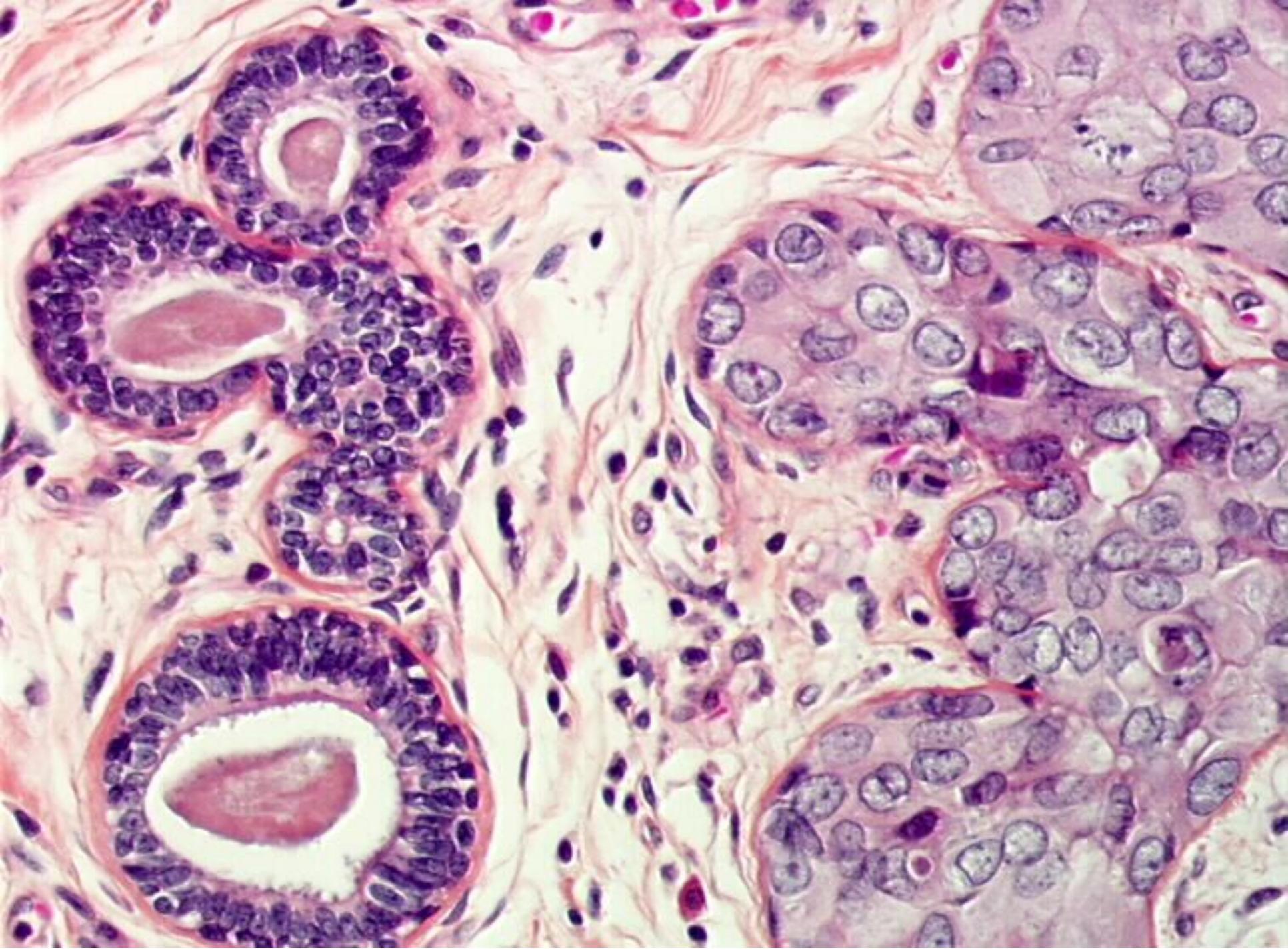
09/2/11

001702

Superfrost



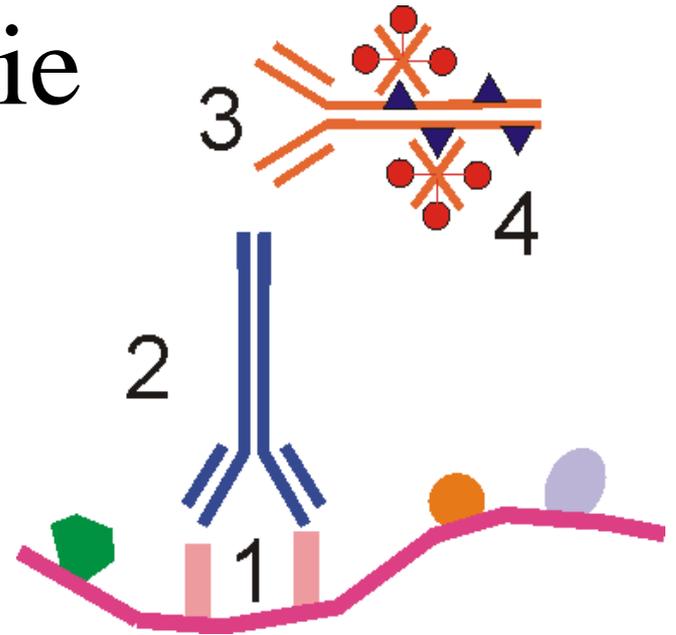




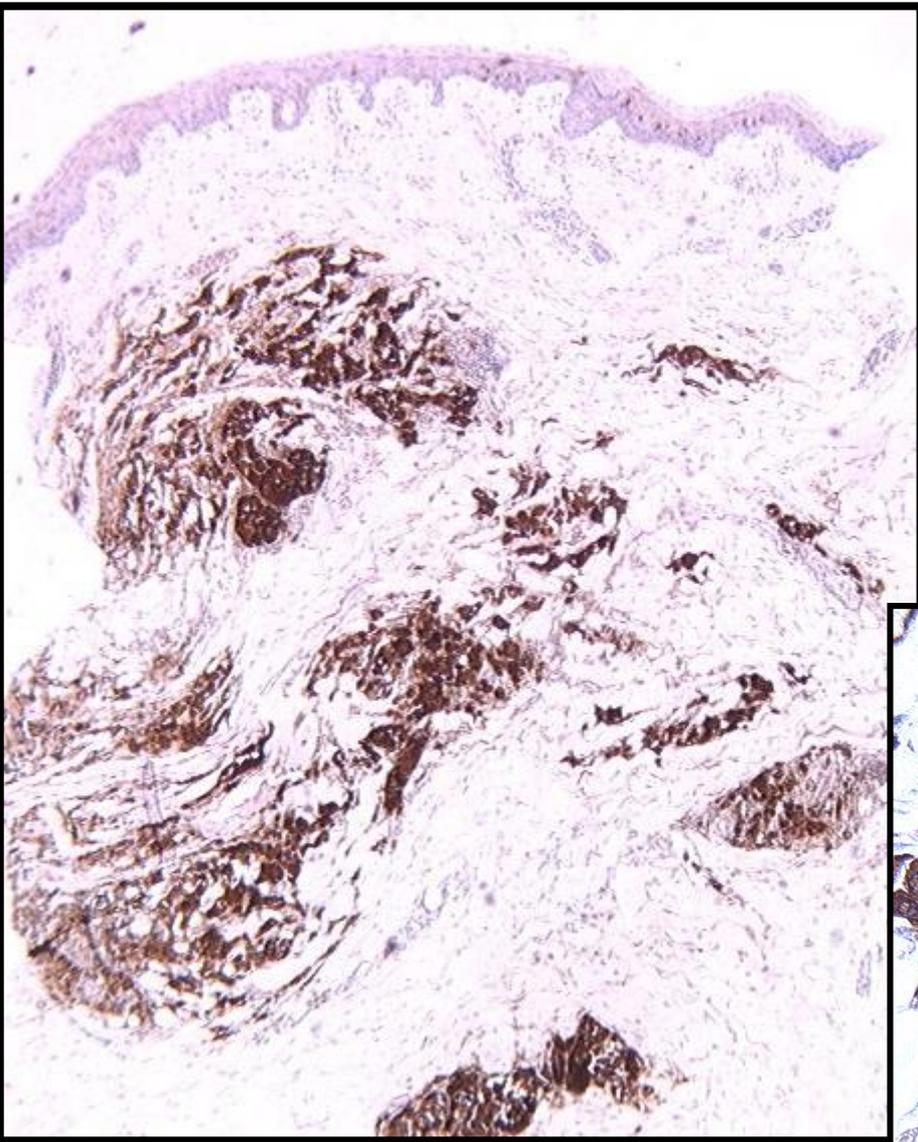
Morphologie cellulaire : « chercher le mouton noir »



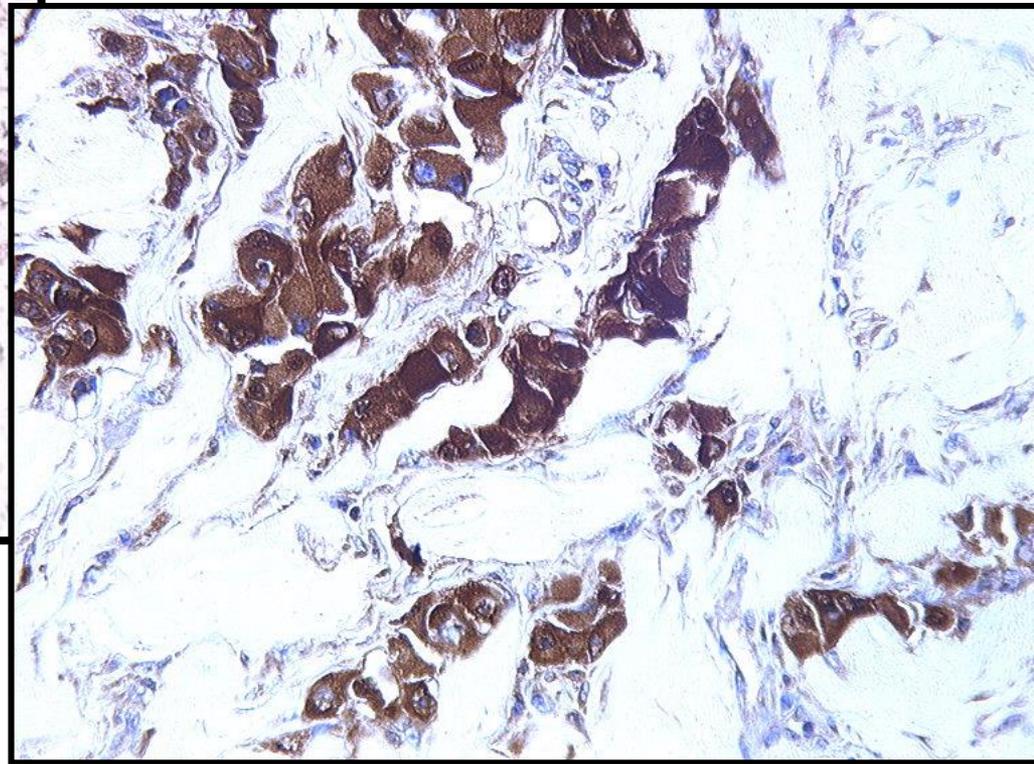
Aller plus loin : Immunohistochimie



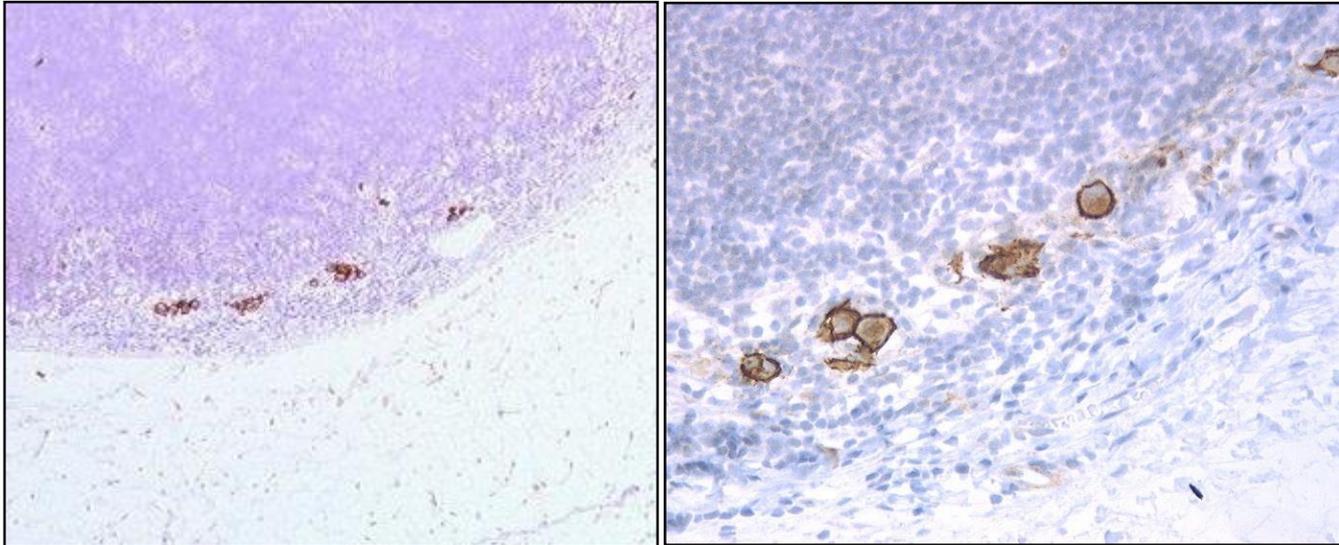
- Depuis 1983
- Présente dans près de 100% des laboratoires
- Auto-prescription !
- *In situ* on sait qui exprime quoi!



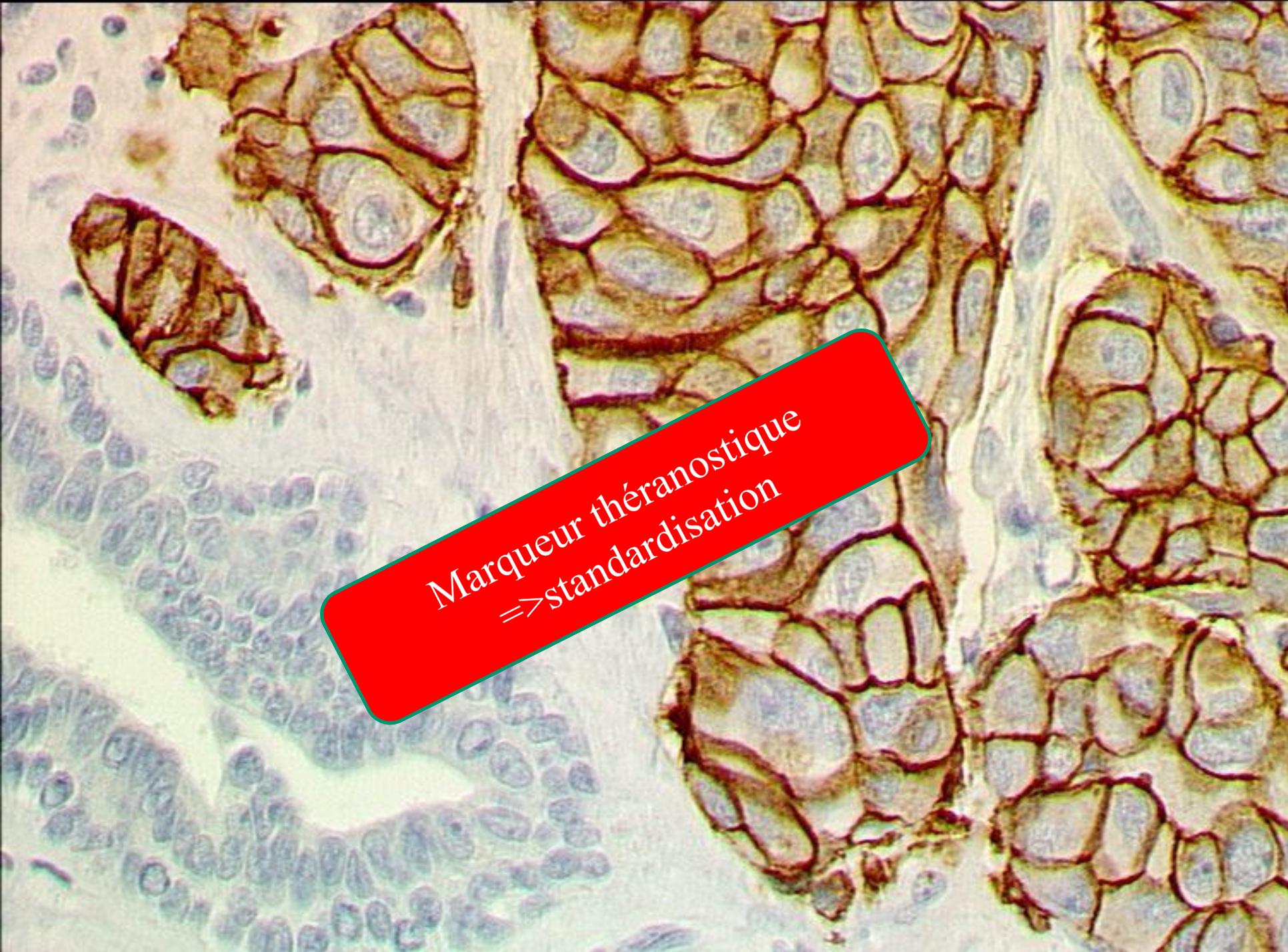
Tumeur cutanée ???
IHC Melan A
=> Melanome



Mélanome et ganglion sentinelle:
recherche de micrométastase par
immunohistochimie avec HMB45, non
décelable sur H&E



Ganglion sentinelle + = Curage ganglionnaire

A histological micrograph showing a cross-section of tissue. The tissue consists of several layers of cells. The outermost layer is a simple cuboidal epithelium. Below this is a layer of cells with a more complex, possibly stratified appearance. The central part of the image shows a large, irregularly shaped structure with a highly convoluted, labyrinthine border, characteristic of a glandular or ductal structure. The cells within this structure are stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing purple nuclei and pink cytoplasm/extracellular matrix. A red callout box with a green border is overlaid on the image, containing the text "Marqueur théranostique" and "=>standardisation".

Marqueur théranostique
=>standardisation

40 Sources de variabilité pré analytique pour la technique IHC

Pré fixation

- Durée et température ischémie froide
- Taille du prélèvement
- Encrage
- Découpe du prélèvement

Fixateur

- Type de formol
- Concentration
- Tampon
- Age du réactif
- Méthode de préparation

Fixation

- Rapport volume prélèvement/volume fixateur
- Méthode (immersion, injection, sonication, micro-O)
- Durée de fixation
- Mouvement
- Exposition lumière
- Co-fixation avec autre prélèvements

Post fixation

- Temps et conditions de lavage
- Temps et type de réactif de stockage

Inclusion

- Type d'automate, entretien, maintenance,
- remplacement réactifs
- Rapport volume prélèvements/volume réactifs
- Nombre et position des autres prélèvements dans l'automate

Déshydratation et clarification

- Réactifs
- Température
- Nombre de bains
- Durée totale et durée par bain

Imprégnation en paraffine

- Type de paraffine et température de fusion
- Nombre de bains
- Durée totale et durée par bain
- Méthode : immersion, sonication, micro-O

Enrobage paraffine

- Type de paraffine et température de fusion
- Automate enrobage?

Microtomie

- Type de microtome
- Type de lame de rasoir et fréquence de remplacement
- Température du bloc de paraffine durant la coupe
- Prétraitement de la lame de verre
- Etalement et adhésion des coupes tissulaires
- Adhésifs chimiques si utilisés
- Épaisseur des coupes
- Température et durée de séchage des coupes tissulaires

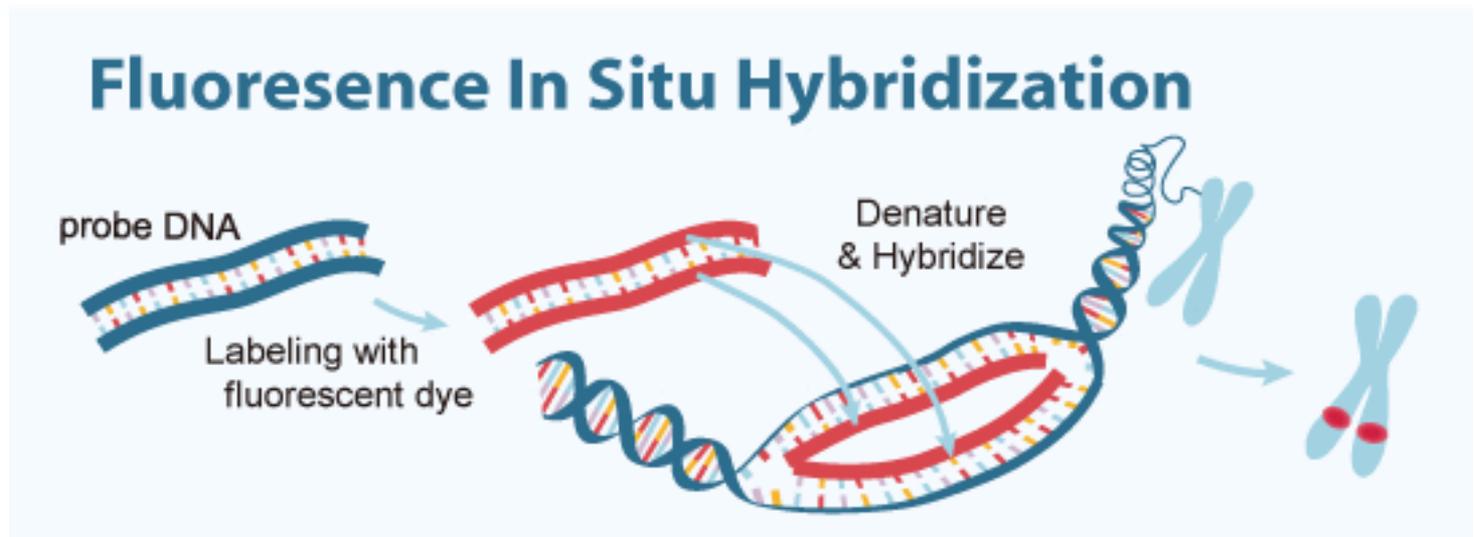
Effects of Preanalytical Variables on the Detection of Proteins by Immunohistochemistry in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue

Engel et Moore Arch Pathol Lab Med 2011



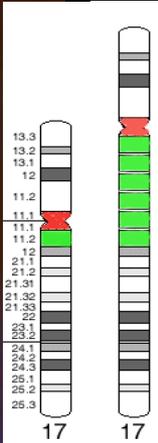
Standardisation des techniques !

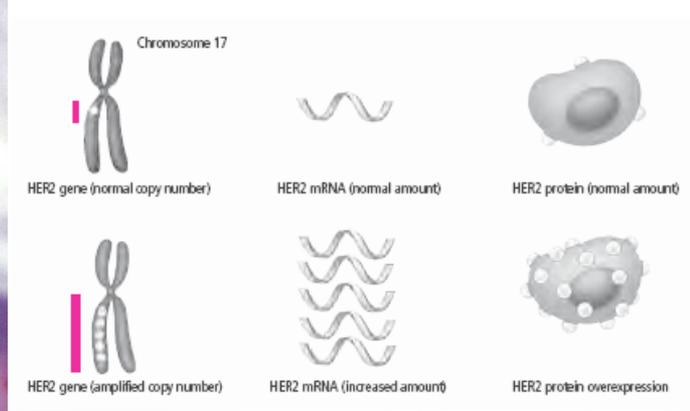
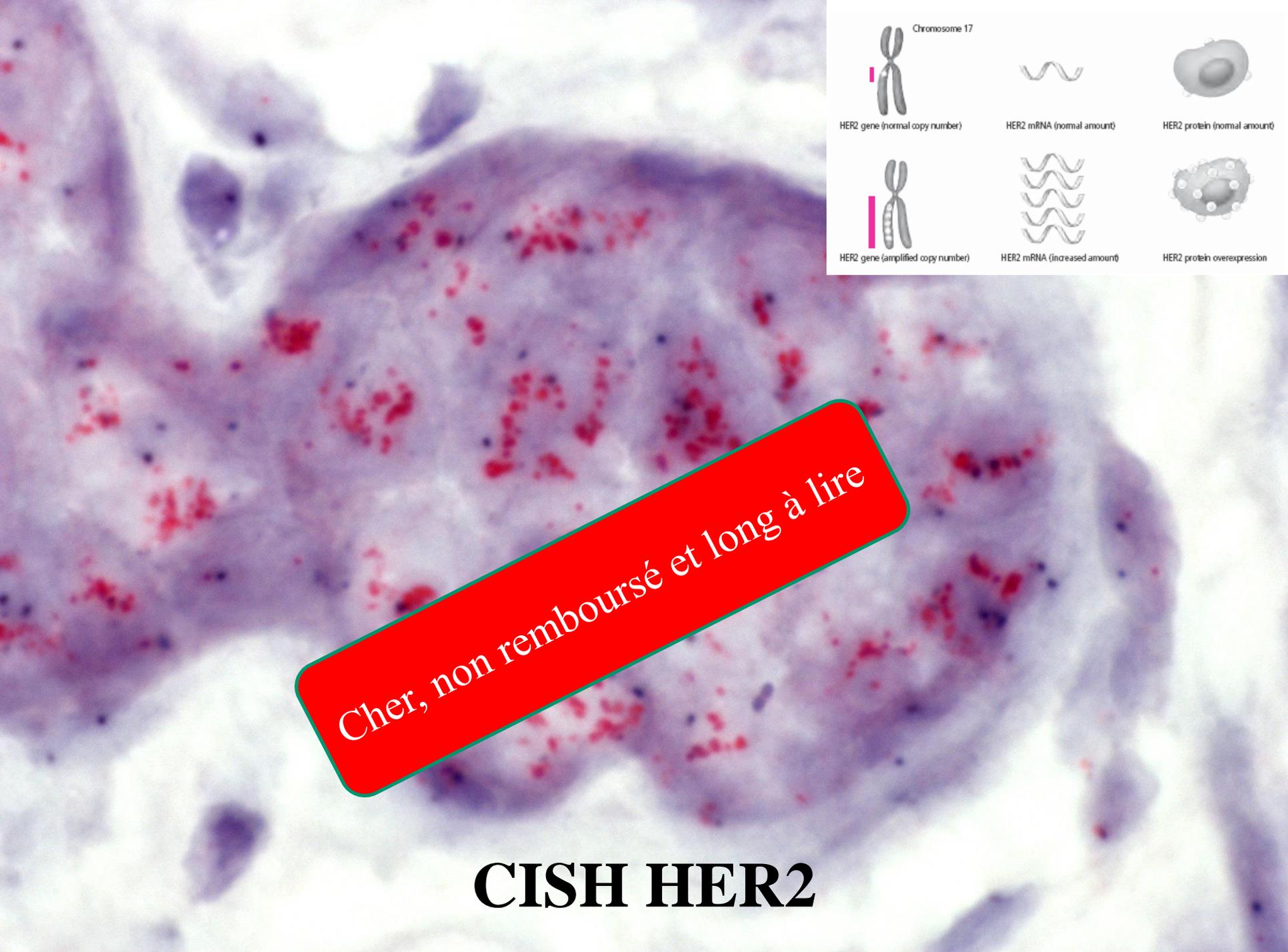
Toujours plus loin : hybridation *in situ*. ex. FISH



- Depuis 1990
- Présente dans les gros laboratoires
- Auto-prescription !
- *In situ* on sait qui exprime quoi!

Cher, non remboursé, long à lire,
microscope spécial très cher





Cher, non remboursé et long à lire

CISH HER2

Aller toujours plus loin :

ADN et/ou ARN

- Extraction
 - Paraffine + (max 300pb)
 - Congélation +++ (pas de limite, millions de pb)
 - Techniques nombreuses et +/- quantitatives
 - Broyage => qui donne quoi ???

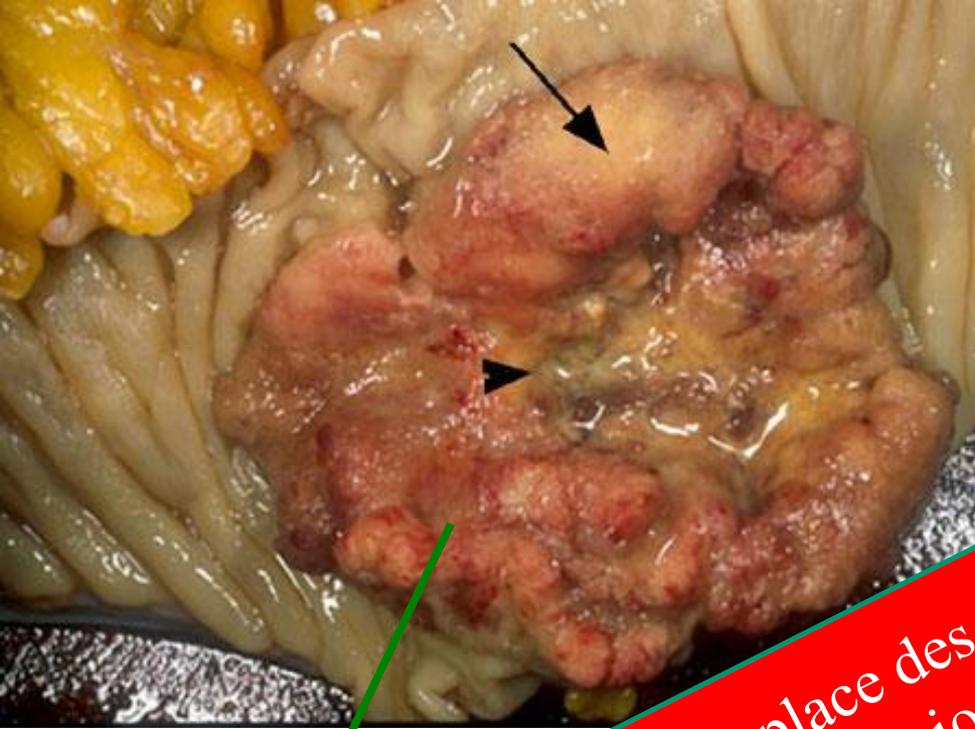


Fixation



Congélation

Congélation



Mise en place des tumorothèques régionales

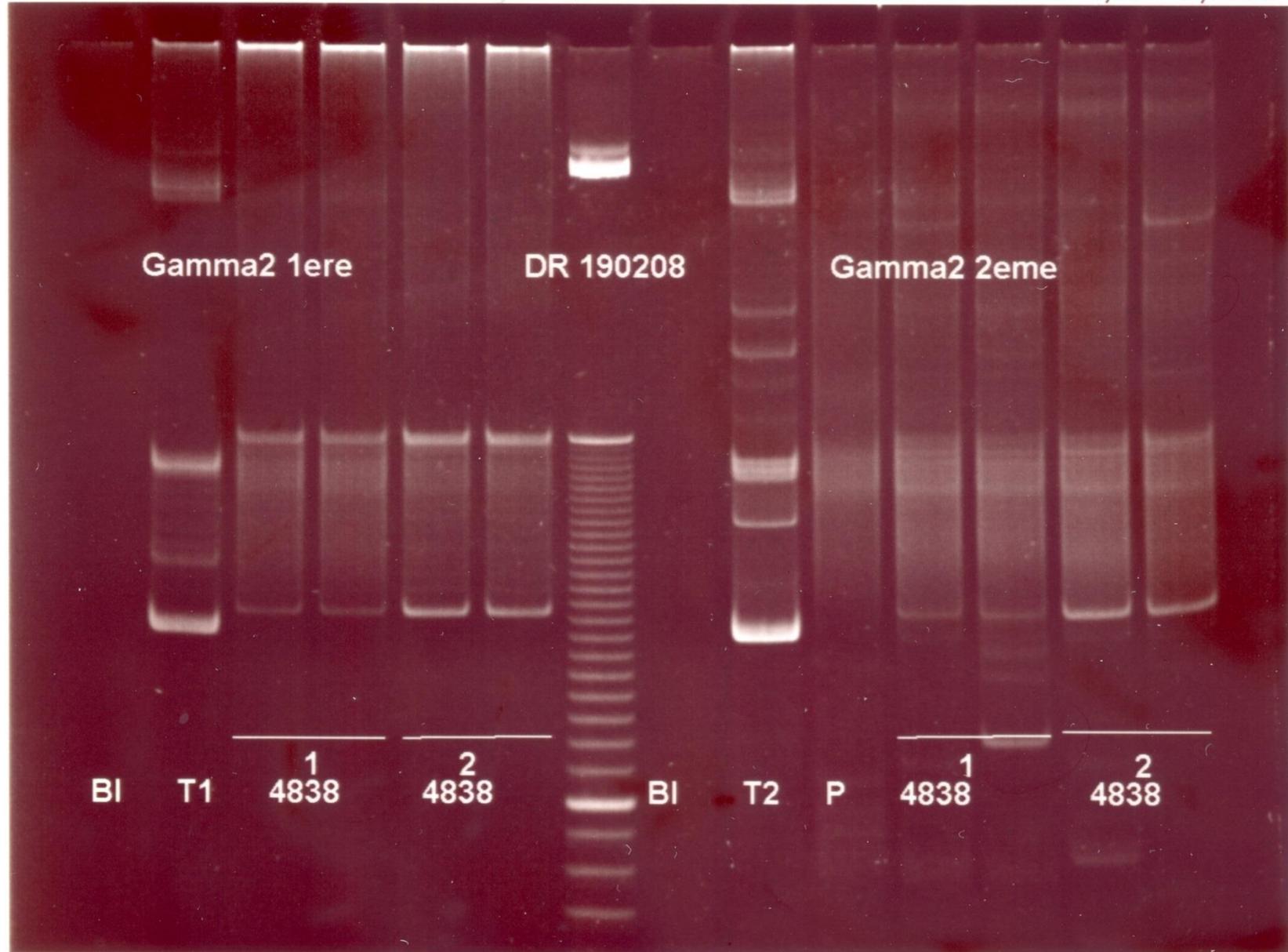


Image7

1203511815

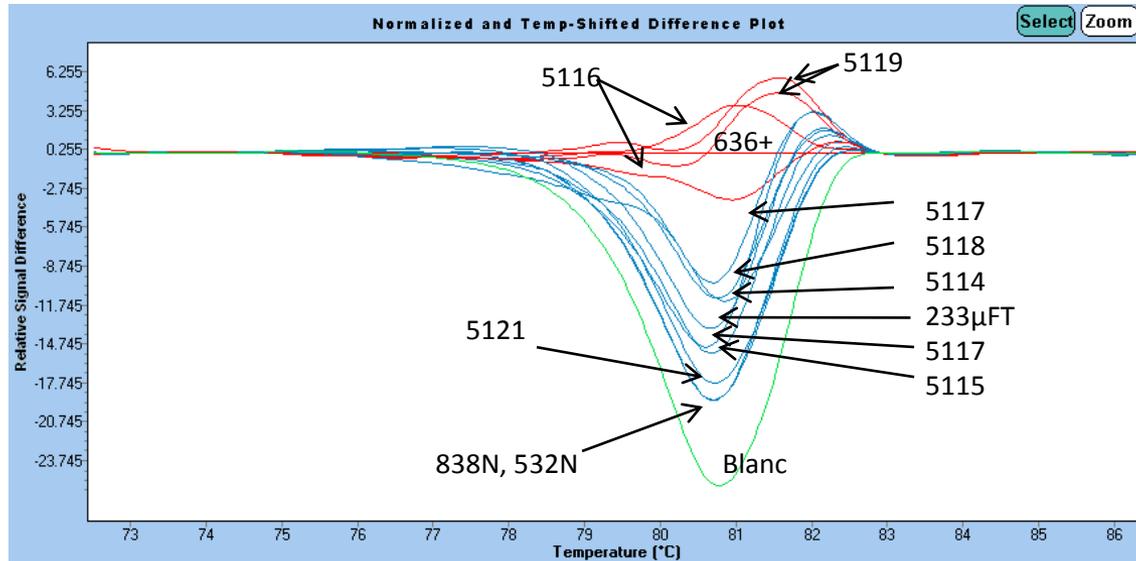
Réarrangement du gène du TCR γ

User mercredi 20 février 2008 13:50:15 B=13 W=4095 G=1,00 I=0,900s

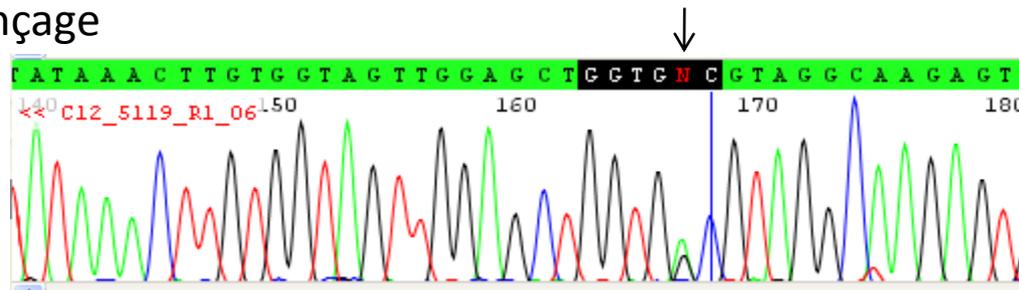


Recherche de mutation de k-ras

High Resolution Melting :



Séquençage



Cas 5119 muté
c.38G>A ; G13D

Aller ENCORE plus loin : ajouter le débit

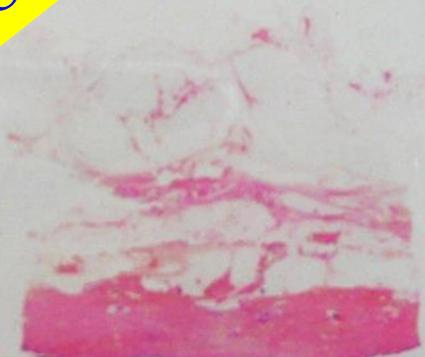
- Utiliser des techniques à haut débit
 - Avec NGS => Téra octet de données
 - Informations nombreuses
 - Interprétation délicate
 - Nécessité de maîtriser les systèmes experts
 - Nécessité d'algorithmes validés !
 - *Techniques trop puissantes pour « un patient »*
 - *Evolutions technologiques très rapides*

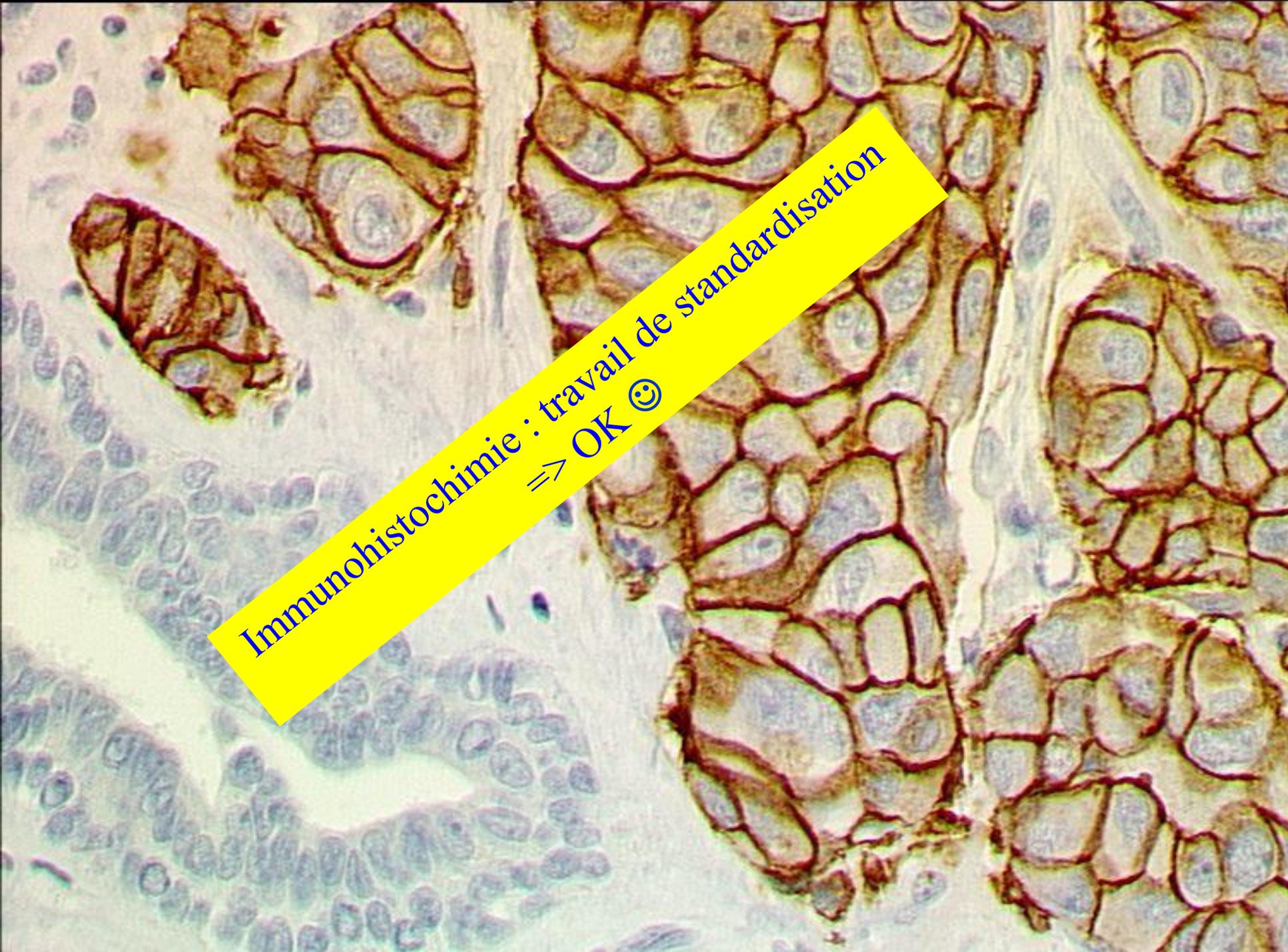
Et les anapath dans tout ça?



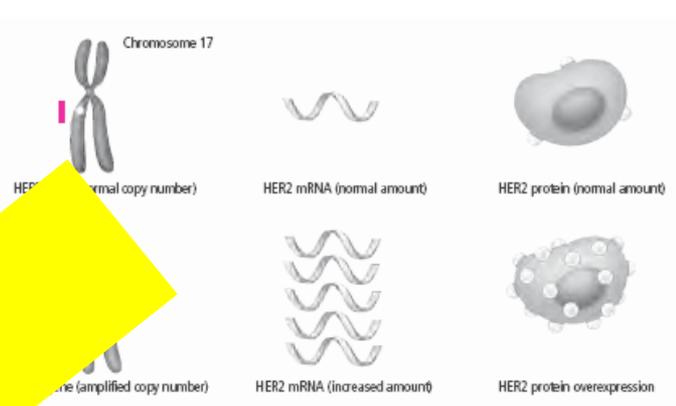
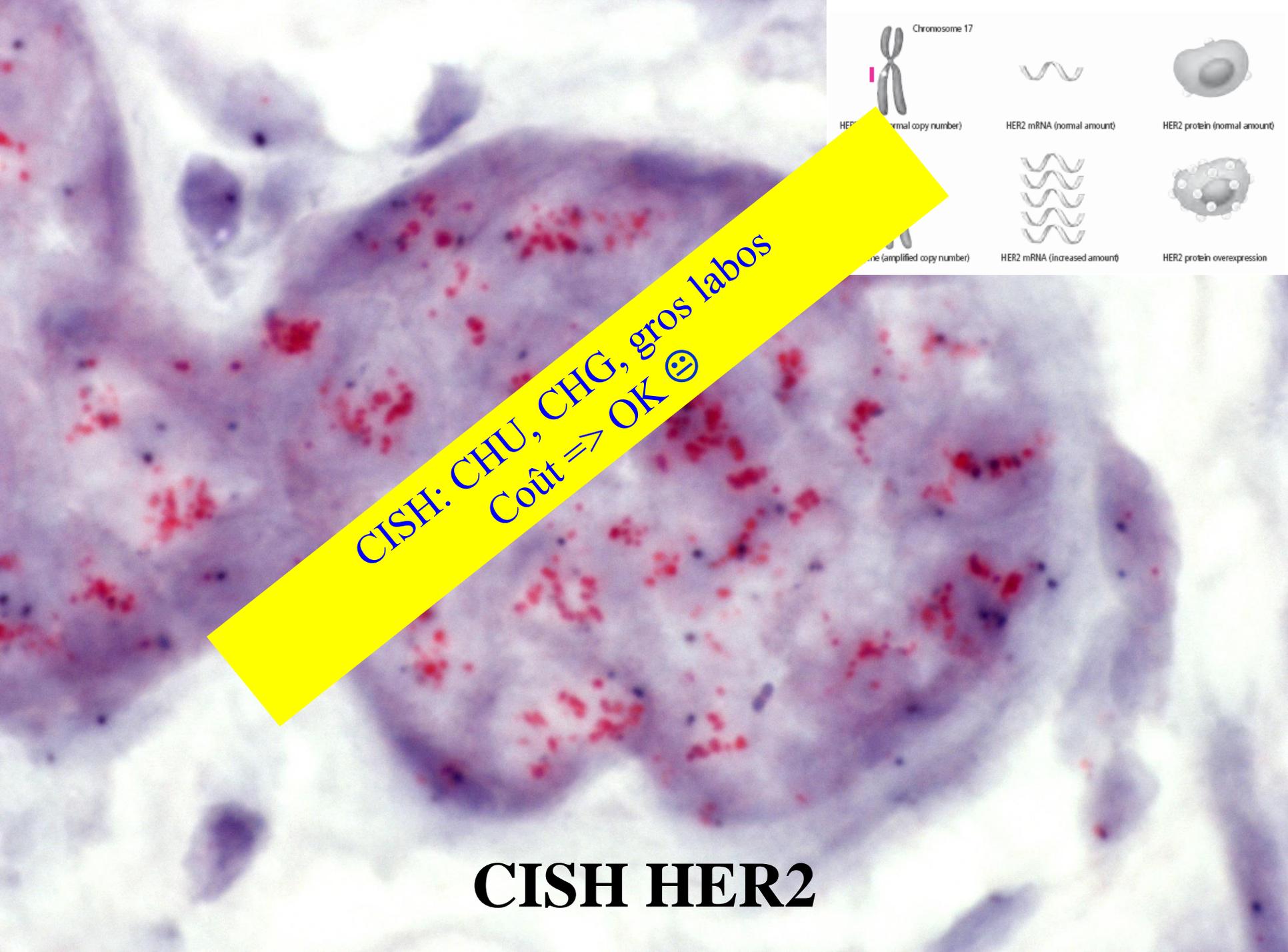
09/2/11
001702

Colorations standards : OK 😊



A histological section of tissue, likely from the gastrointestinal tract, showing glandular structures. The glands are lined by a layer of cells, and the surrounding stroma contains connective tissue and scattered inflammatory cells. The brown staining highlights the cell membranes and some intracellular components, indicating the presence of a specific antigen. A yellow diagonal banner is overlaid on the image.

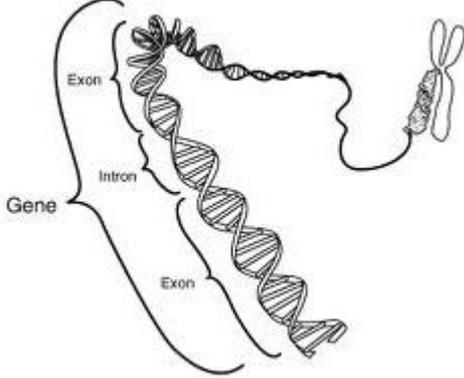
Immunohistochimie : travail de standardisation
⇒ OK ☺



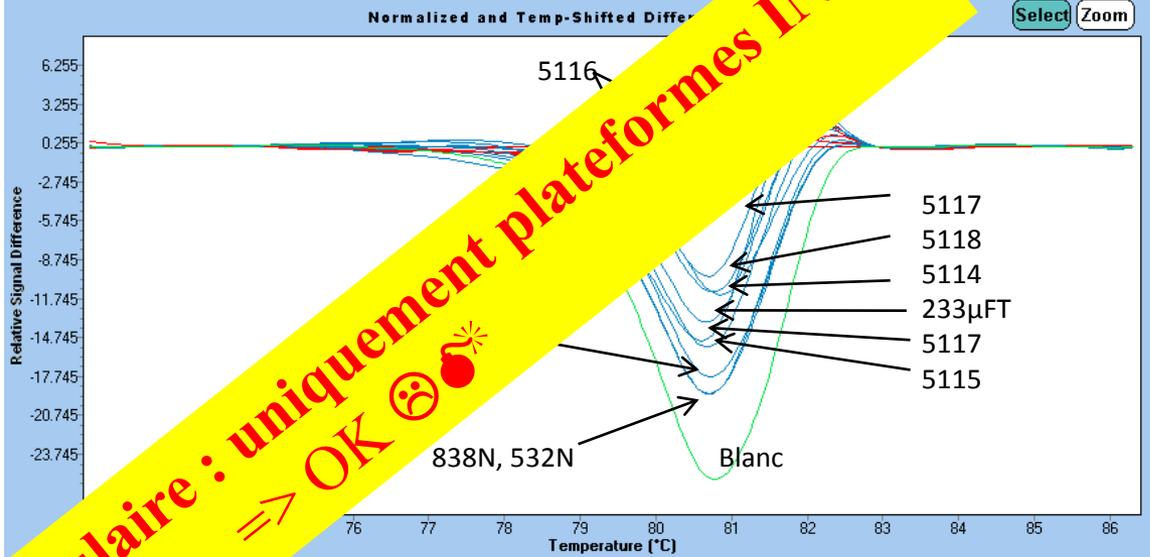
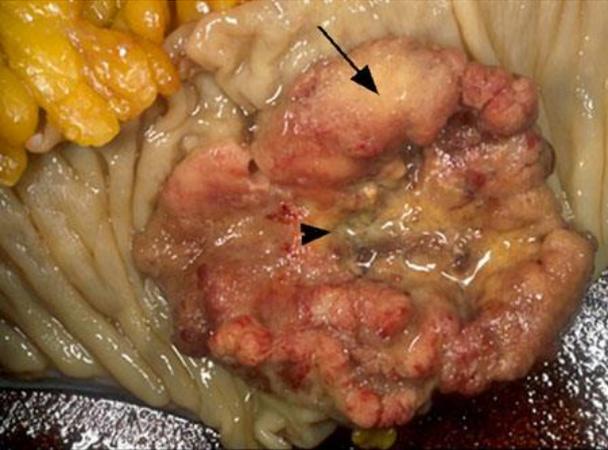
CISH: CHU, CHG, gros labos
Coût ⇒ OK ☺

CISH HER2

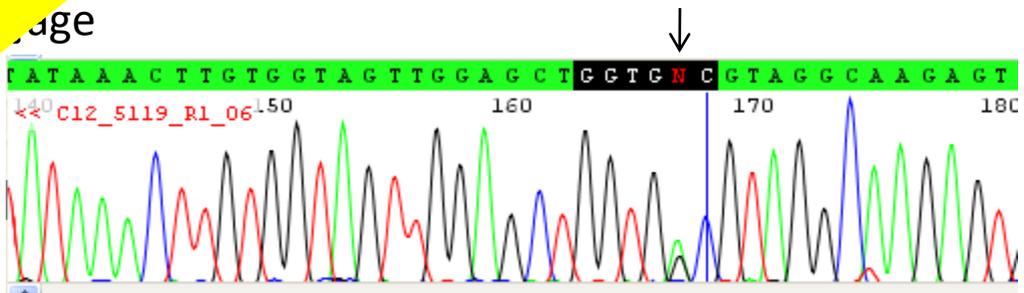
Recherche de mutation de k-ras



High Resolution Melting :



Biologie moléculaire : uniquement plateformes INCa
 ⇒ OK ☹️💣



Cas 5119 muté
 c.38G>A ; G13D

Diagnostic pathologique

Accessibilité des techniques

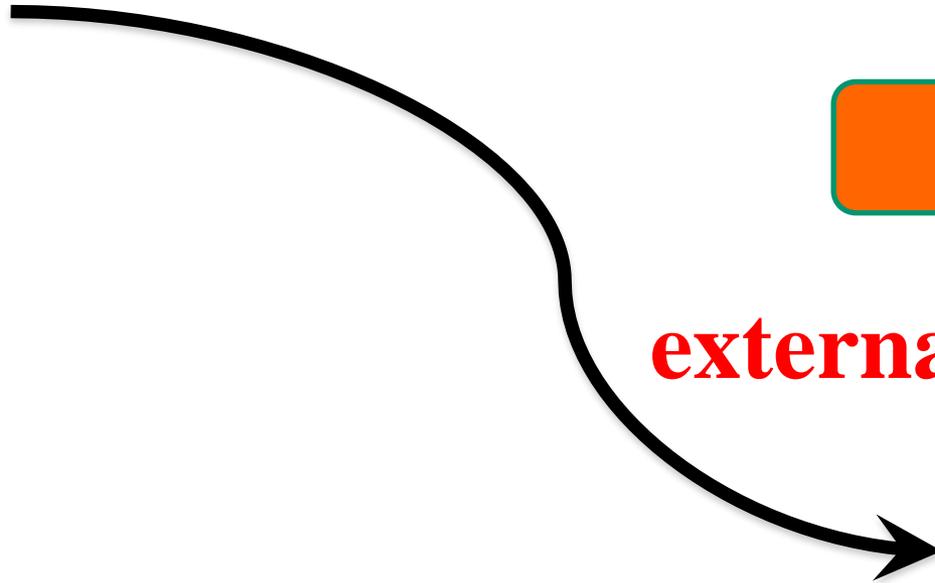
morphologie (1870)

immunohistochimie (1985)

FISH (2000)

externalisation

biologie moléculaire (2005)





Dii
conférences

Paris, 21 Mai 2015

4^e Conférence Annuelle Biomarqueurs 2015

**LA PLACE DES BIOMARQUEURS DANS LA
CHAÎNE DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE
: UN REGARD COMPARATIF
USA/EUROPE/FRANCE**

- Dr Elisabeth Russ
- Présidente du Syndicat des Médecins Pathologistes Français



ALLEMAGNE : LA REFERENCE

- **La pathologie moléculaire ne peut être réalisée que par des pathologistes**
- Ce qui caractérise les études de pathologie moléculaire en médecine, c'est la référence et le repositionnement envers la morphologie.
- L'inclusion de la méthodologie moléculaire dans le canon des méthodes de cette spécialité est l'expression du développement continu de cette spécialité en réponse aux exigences de la prise en charge médicale.

FRANCE : TERRE DES INEGALITES PUBLIC/PRIVE

- 28 PLATEFORMES DE GM
- STRUCTURATION INCa : **SYSTEME HOSPITALO-CENTRIQUE**
- **DEMOTIVANT ET DEQUALIFIANT** POUR LE PATHOLOGISTE LIBERAL ET DES CHG
- SOUS PRETEXTE DE GRATUITE DES TESTS : VOLONTE DE L'INCa DE DONNER **L'EXCLUSIVITE DES TECHNIQUES MOLECULAIRES AUX CHU ET CLCC**

FRANCE : TERRE DES INEGALITES PUBLIC/PRIVE

GRATUITE DES TESTS : PATIENTS METASTATIQUES DÉJÀ PRIS EN
CHARGE A 100%

2/3 DU DIAGNOSTIC CANCEROLOGIQUE EN France

REALISEE EN SECTEUR LIBERAL

PLANS CANCER : AUCUN FINANCEMENT NE BENEFICIE A L'ACP EN
SECTEUR LIBERAL

Le pathologiste et les évolutions techniques

- **Inquiétude** d'être exclus des technologies du futur
- Sensation d'être **sacrifié** au lobby des biologistes
- Vrai sentiment d'injustice

**Plus des inquiétudes d'origine administrative
que technique ou de formation**



Pourquoi cette position de l'INCa

- +++ maîtrise par budget global
- Mise en place dans l'urgence => gens formés
- Mise en place d'indicateurs
- Lobbying ???



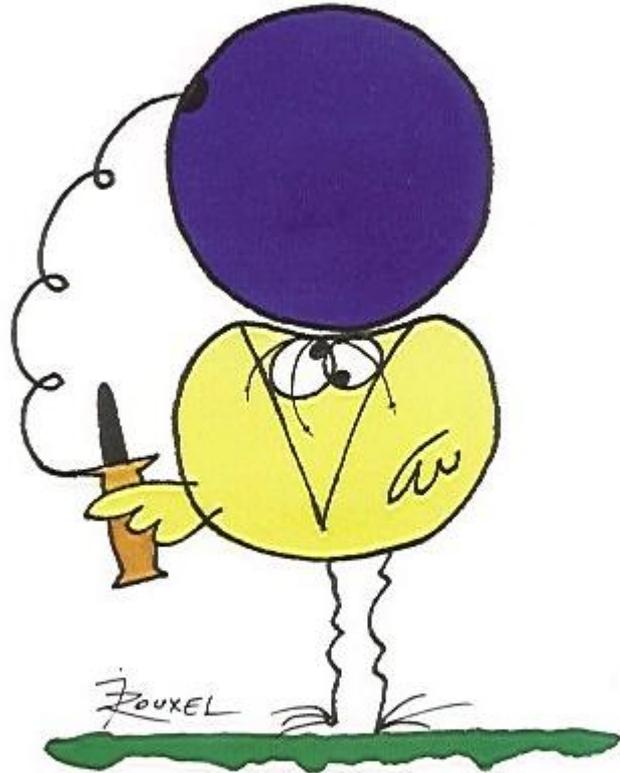
Ébauches de réponses ?

- Tumorothèque régionale fonctionnelle
- Mise en place d'un DIU de pathologie moléculaire
- Vacances pour les pathologistes dans les plateformes ?

1968

traitement probabiliste

Les devises Shadok

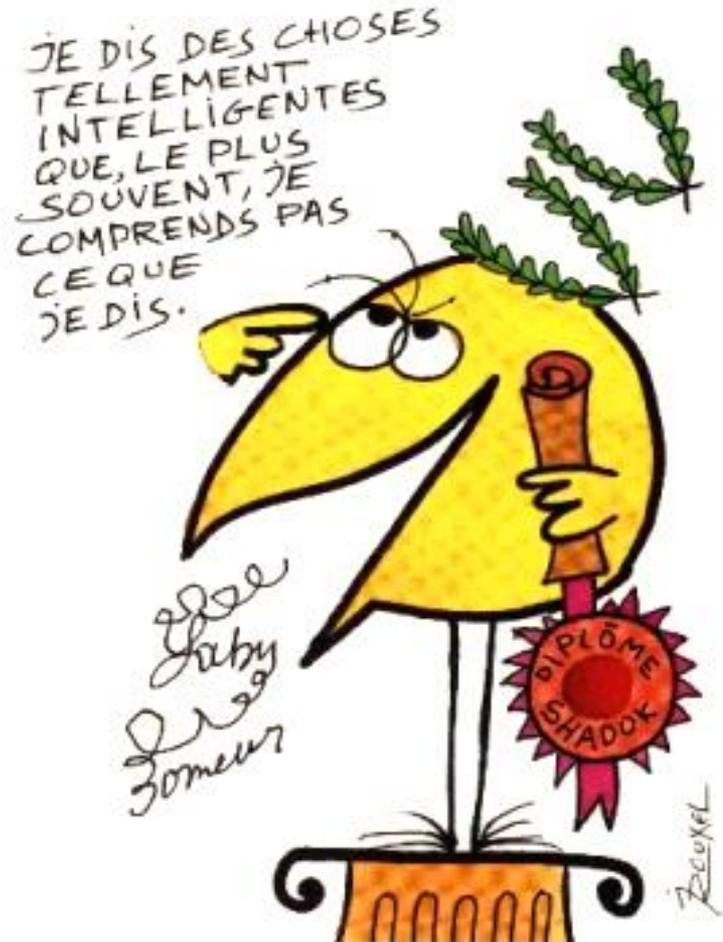


EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

2015

traitement adapté

Les devises Shadok



JE DIS DES CHOSES
TELLEMENT
INTELLIGENTES
QUE, LE PLUS
SOUVENT, JE
COMPRENDS PAS
CE QUE
JE DIS.