Anatomie Pathologique
Vendredi 21 mars 08
10h30
Par Philippe Bertheau
Ronéo de Valette Marie

INTERET DE L'ANALYSE DU TISSU TUMORAL POUR LA PRISE EN CHARGE D'UN PATIENT CANCEREUX

PLAN :

1. Prise en charge d'un échantillon tumoral
   1.1Prises en charge : classique et intégrée
   1.2Devenir de l'échantillon
   1.3Congélation
   1.4L'intérêt des tumorothèques

2. Exemple du cancer du sein
   2.1Examen histopathologique standard
   2.2Examens moléculaires avancés
   2.3Compte-rendu complet
   2.4Perspectives

3. Rôle du pathologiste en cours de traitement

4. Conclusion

5. Microscopie digitale

6. La spécialité anatomopathologie

1. Prise en charge du tissu tumoral

Rôles du Pathologiste en cancérologie

Avant le traitement :

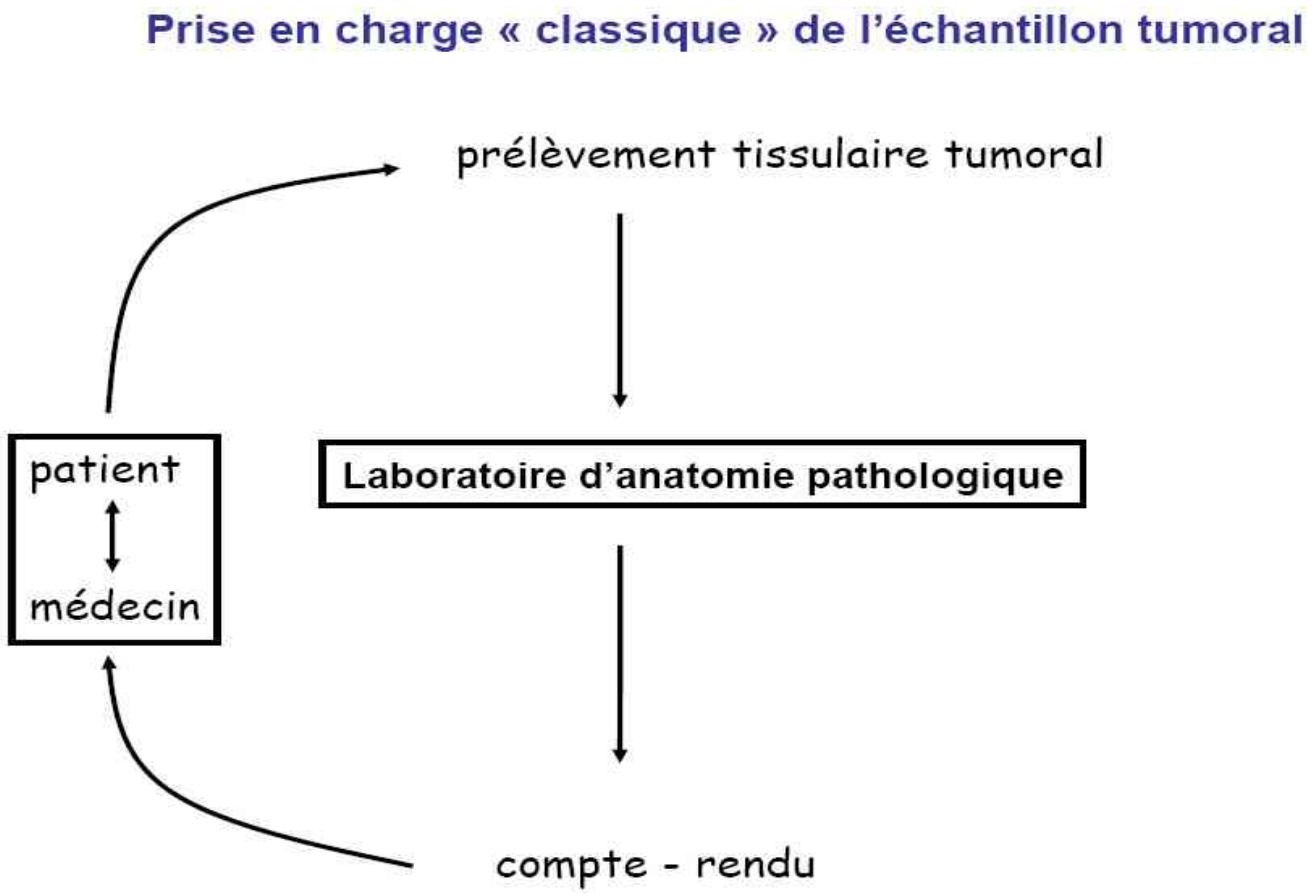
- Diagnostic *: identifier la maladie en étudiant le tissu tumoral par différentes techniques*
- Pronostic : *cela va au-delà du diagnostic, il peut être considéré comme l'évolution naturelle de la maladie en absence de traitement*
- Facteurs prédictifs de la réponse aux traitements : *savoir si le patient va répondre ou non au traitement, trouver chez le patient des informations qui nous permettront de le dire*

En cours de traitement :

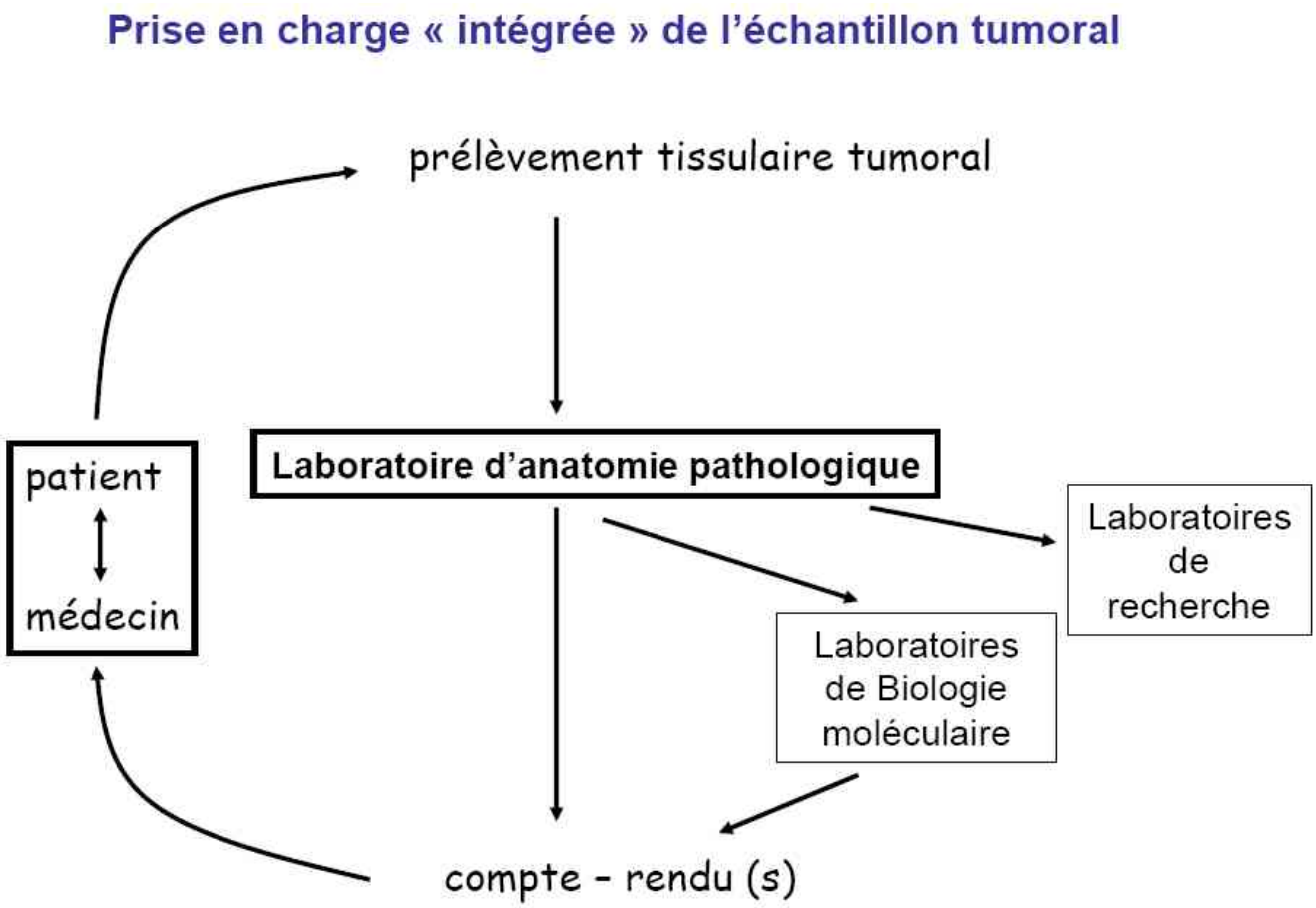
- évaluation de la réponse thérapeutique afin d'éventuellement adapter les traitements ultérieurs : *le patient répond-il bien ou non au traitement en cours ?*

1.1 Prise en charge classique et intégrée

Tout d'abord quelques petits rappels :
Lorsqu'on fait un prélèvement sur un patient, cet échantillon passe dans un laboratoire d'anatomie pathologique et va être étudié selon un certain nombre de techniques afin de rendre par la suite un compte rendu. C'est la stratégie CLASSIQUE.



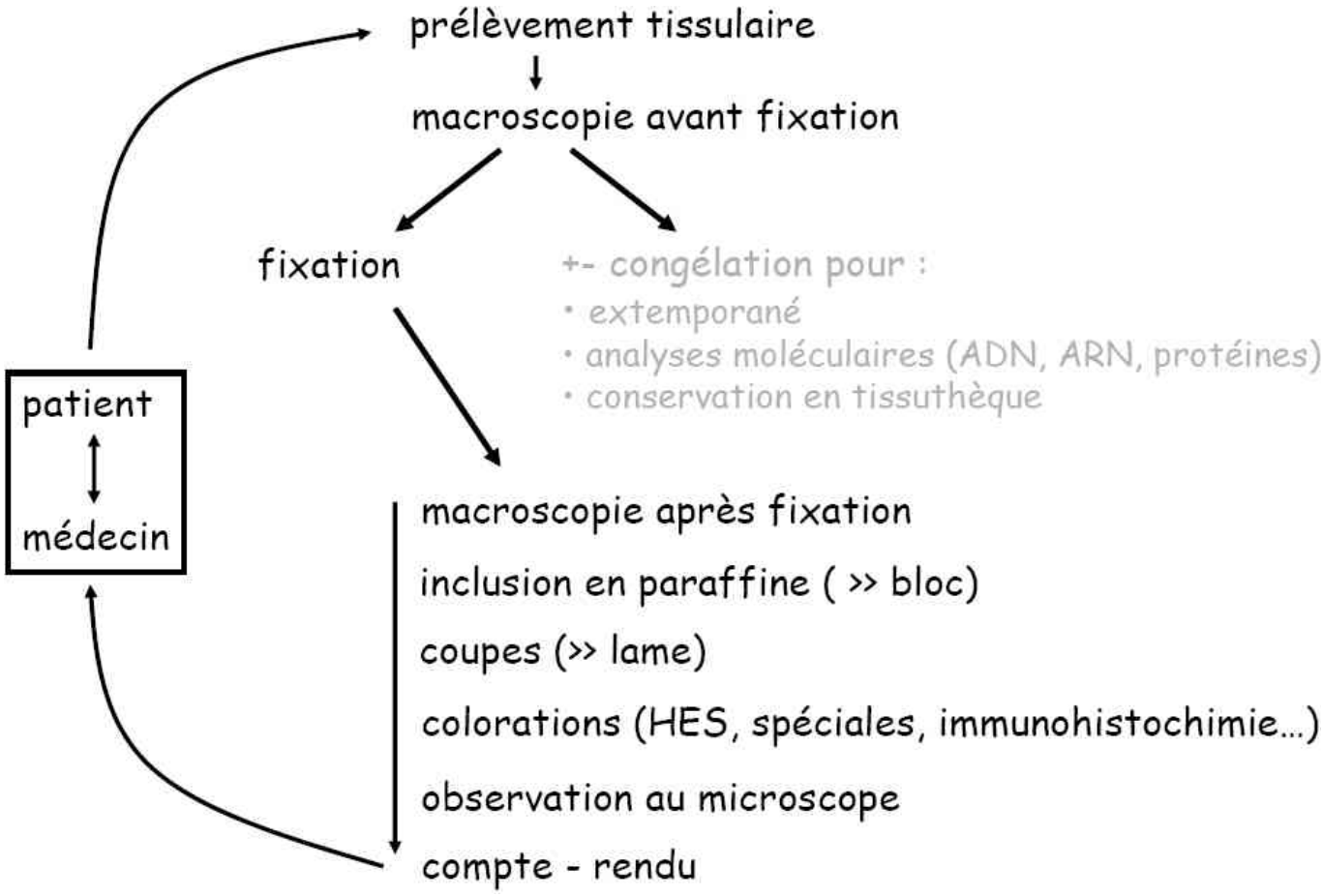
Depuis quelques années, les laboratoires d'anatomopathologie se sont considérablement ouverts non seulement aux malades mais aussi au reste du plateau technique et particulièrement à leurs collègues biochimistes. Cela devient une prise en charge INTEGREE de l'échantillon tumoral.



Toutes les données issues des différents laboratoires sont condensées en un compte rendu global, qui illustrera les données d'anatomopathologie mais aussi biologiques.

1.2 Devenir de l'échantillon

On va revenir très rapidement sur la procédure classique du service d'anatomie pathologique :
On effectue un prélèvement tissulaire puis une macroscopie et l'échantillon est fixé ou congelé (ce qui permet de le communiquer à d'autres laboratoires)
La fixation macroscopique permet de faire un bloc puis des coupes qui sont colorées, on les observe par la suite au microscope.
La fixation du tissu se fait dans du formol mais cela ne permet pas de faire des études moléculaires car l'échantillon est altéré au niveau biochimique alors que la congélation le conserve dans un état parfait.



Les analyses moléculaires peuvent être immédiates ou alors les tissus peuvent être conservés à très long terme
L'examen extemporané donne un résultat en direct au chirurgien qui attend une réponse rapide pour la suite de son opération.

Les analyses moléculaires immédiates : techniques :

A partir de cet échantillon pris dans une substance qui se solidifie au froid et qui permet de le conserver, on peut effectuer des analyses mais un traitement préalable est nécessaire.
On met le tissu dans un cryostat qui est un microtome à froid (-20 degrés), qui va couper l'échantillon avec des lames de rasoir en coupes de quelques microns (plusieurs coupes)
Ces quelques microns de tissu peuvent être insérés dans des tubes de plastique fermés hermétiquement. Ce tube peut être communiqué à d'autres labos plus compétents pour d'autres analyses.

Pourquoi découper un fragment ?

Car l'expérience a prouvé que les extractions moléculaires sont bien plus performantes alors que le tissu est déjà découpé en coupes de 5 à 6 microns.

Stockage

Les échantillons peuvent être stockés dans une tumorothèque, tissuthèque, centre de ressources biologiques ou encore plateformes de ressources biologiques.
Leur intérêt est de conserver une banque de données d'échantillons, réutilisables plusieurs années après, ce qui peut être très utile dans l'intérêt du patient et pas seulement pour la recherche.
Avant même de donner des prélèvements à d'autres labos, on s'assure d'un prélèvement qui ira vers une tumorothèque (il faut aussi vérifier que ce soit bien du tissu tumoral et non du tissu sain ou nécrosé adjacent)

1.3 Congélation

Quand faut-il congeler un fragment de tissu ?

Le plus vite possible car lorsqu'on enlève le tissu il se produit des phénomènes d'hypoxie et d'anoxie majeurs (du fait de la perte de la vascularisation) qui commencent à dégrader le tissu.
La demi vie de certains éléments tissulaires est très courte notamment des ARN qui est de environ 10min.
Si le prélèvement traîne pendant 15min sur une paillasse il devient inutile. Les analyses moléculaires demandent donc d'avoir une chaîne bien rodée :le chirurgien qui prélève, l'infirmière qui envoie le prélèvement et un transport rapide aux labos.

Les modalités de congélation :

Le fragment congelé peut être mis dans un tube un peu spécial : les cryotubes qui ont la particularité de résister à l'azote liquide (-200degrés). Le fragment tissulaire est déposé sur une languette stérile, inséré dans le cryotube et immergé dans l'azote liquide.
Le problème de ce moyen de conservation est qu'au moment de l'ouverture cela peut exploser car cela se réchauffe très rapidement et détruire l'échantillon, les tubes doivent donc être spécifiques à une congélation extrêmement froide.
IL existe plusieurs types de cuves ou containers pour conserver les échantillons dans l'azote avec des tailles et des autonomies différentes : par exemple pour le transport d'une pièce à l'autre, pour la conservation pendant plusieurs jours ou même de longue durée
Ce moyen de conservation est très efficace (puisque des congélateurs à -20 ne suffisent pas pour conserver pendant de longues durées) car aucune dégradation n'est possible mais elle est coûteuse et peut être dangereuse dans certains cas. Pour une conservation de longue durée, l'azote n'est pas forcément nécessaire mais il faut au moins une température inférieure à – 80 degrés.

1.4 L'intérêt des tumorothèques

Les échantillons dans une tumorothèque ont un intérêt pour le patient mais aussi pour la recherche.

- l'intérêt individuel :
  Des années après l'exérèse ou le traitement d'une tumeur, il peut y avoir des récidives.
  Du coup entre le moment où on a fait les prélèvements tumoraux et la récidive, de nouveaux tests moléculaires (découverte de nouveaux marqueurs, nouveaux traitements…) ont pu être inventés et cela peut ouvrir de nouvelles perspectives pour la thérapeutique du patient. On a aussi un intérêt diagnostique, pronostique et cela permet d'avoir une prédiction de la réponse thérapeutique.

Quand on décide de faire des protocoles de recherche où on va sortir des dizaines ou centaines d'échantillons, on garde toujours au moins un petit échantillon pour chaque patient car on peut toujours en avoir besoin en cas de problèmes ultérieurs.

- l'intérêt collectif :
  On utilise les échantillons tumoraux pour la recherche mais il y a des limitations :
  -le diagnostic est prioritaire
  -l'utilisation des échantillons nécessite le consentement du patient (oral au moins) : le patient doit être informé que l'échantillon issu de sa tumeur va être utilisé à des fins de recherche (requalification pour la recherche depuis les lois de 2004)

2. Exemple du cancer du sein

CAS CLINIQUE :

Une femme de 50ans consulte son gynécologue car une mammographie de dépistage a montré une opacité suspecte dans son sein gauche. L'interrogatoire retrouve un antécédent de cancer du sein chez la mère.
Sur la mammographie (photo sur le site de la fac) on observe donc une lésion principale et une lésion satellite dont on distingue mal les contours. Elle est suspecte et nécessite des examens complémentaires.
(On ne dit pas que c'est un cancer, la seule personne habilitée à donner ce diagnostic est le pathologiste qui étudie le tissu)

On étudie ce genre de lésions grâce à une biopsie :
Ce sont des systèmes de biopsie à l'aiguille : l'unité G(Gauge) indique le diamètre des carottes faites à des aiguilles. Plus l'unité est élevée, plus la carotte est fine (par exemple 11, 14, 16,18 G).
Le radiologue (?) qui fait ces biopsies va en faire deux ou trois supplémentaires pour être mises dans l'azote liquide à des fins de conservation.

2.1 Examen histopathologique standard :

Les prélèvements de la biopsie sont étudiés et donnent pour résultats (photo sur le net) :
L'observation d'un adénocarcinome (cancer de l'épithélium glandulaire) canalaire (spécificité du sein), infiltrant (le contraire de in situ, a peut être déjà dépassé la membrane vasculaire) qui est :

- peu différencié
- avec noyaux atypiques
- et de nombreuses mitoses

Le grade histologique permet de pressentir le coté agressif ou indolent de la tumeur.

Cela correspond à un grade 3 dans la classification Scarff et Bloom (spécifique au cancer du sein). Ce grade est assez agressif et nécessite sûrement une chimio adjuvante.
La patiente va être opérée (tumorectomie, différent de la mastectomie où l'on retire tout le sein) et subit un curage ganglionnaire. Pour ce type de tumeur de taille modeste, on peut se permettre de la retirer de

manière chirurgicale en premier lieu alors que pour d'autres tumeurs plus importantes, une chimiothérapie devra précédée l'exérèse (car à chaque fois que l'on fait la chirurgie avant la chimio, cela se passe mal !)

Le pathologiste reçoit la tumeur retirée du sein pour effectuer des prélèvements, on fait une macroscopie avant fixation puis une fixation et une congélation.
Cet examen histopathologique dit définitif (à partir des résultats d'anatomopathologie) concerne la tumeur elle-même mais également les ganglions :
Ici sur 14ganglions, 2métastases sont découvertes. Au delà de 3 cela modifie toute la thérapeutique

Rappel rapide à propos de la TNM :

- Taille=2,5cm qui donne un stade pT2
- 2ganglions axillaires métastatiques qui donne un stade pN1 (N ce sont les ganglions)
- Métastases à distance ? MX (métastases non ganglionnaires, dans le foie, l'estomac…)

PT2, pN1, Mx----------stade 2 (OMS)

Le compte rendu standard ressemblera à ça :

Adénocarcinome canalaire infiltrant du sein gauche mesurant 2,3cm de grade pronostique III (Scarff and bloom) d'exérèse complète.
Présence de 2 ganglions métastatiques sur un total de 14ganglions.
Stade : PT2, pN1, Mx----------stade 2 (OMS)

2.2 Examen moléculaire avancé

A partir de là on peut se demander si la tumeur surexprime des récepteurs hormonaux.
Si la tumeur surexprime les récepteurs elle a un meilleur pronostic, on peut donc rassurer la patiente mais cela sert aussi à trouver un traitement : elle aura une sensibilité importante à un traitement anti-œstrogènes.
Elle peut aussi surexprimer HER2, dans ce cas le pronostic est moins bon (en l'absence de traitement) mais il est très sensible à un traitement : le trastuzumab qui est un anticorps monoclonal dirigé contre HER2 porté par les cellules cancéreuses. C'est donc un traitement véritablement ciblé.
Cette tumeur a-t-elle une mutation de P53 (contrôle du cycle et de la mort cellulaire muté dans la moitié des cancers humains)? Si oui le pronostic est moins bon mais la tumeur sera sensible à une chimiothérapie à dose intense qui associe deux molécules : épirubicine-cyclophosphamide.

- Récepteurs hormonaux et cancers du sein

60% des cancers du sein (alors qu'ils touchent 1femme sur 9) sur expriment les récepteurs hormonaux (RH) et sont hormonosensibles (traitement par tamoxifène ou inhibiteur de l'aromatase). Malheureusement il existe souvent des résistances mais cela permet de donner en général plusieurs années au patient.

Comment va-t-on déceler ces sur expressions ?

Il existe des surexpressions aux récepteurs de l'œstrogène (RE) ou de la progestérone (RP). On les étudie avec un immunomarquage avec des anticorps dirigés contre RE ou RP. On visualise l'intensité du marquage ou on compte le nombre de noyaux marqués.
On peut aussi utiliser une PCR quantitative (RT-PCR)

- HER2

Pour HER2, 20% des cancers du sein le sur expriment au niveau de leurs membranes le plus souvent secondaire a une amplification du gène HER2 c'est à dire qu'au lieu d'avoir un seul gène il y a plusieurs copies du gène qui transcrivent beaucoup trop d'ARN messager qui contribueront à la surexpression. Cette molécule est un récepteur à tyrosine kinase qui enclenche une cascade intracellulaire qui entraîne la prolifération cellulaire. La voie de signalisation de HER2 a une action pro tumorale.
L'intérêt de cette surexpression c'est que 30% de ces tumeurs est sensible à un traitement par trastuzumab (anticorps humanisé contre HER2) appelé herceptine dans le commerce.

Comment détecte t –on cette surexpression ?
Par une immunohistochimie qui donnera un marquage membranaire mais c'est un peu plus délicat : par exemple si le marquage est fort et diffus, le marquage sera 3+ !dans ce cas, il n'y aucun problème, le traitement sera efficace. Lorsqu'il n'y que très peu de marquage, la classification sera 0 ou 1+ et dans ce cas on sait que le traitement sera inefficace et on ne leur donnera pas d'herceptine car c'est un traitement coûteux et avec des effets secondaires type cardiopathies. Pour les situations intermédiaires 2+, cela peut faire que la réponse au traitement sera moins forte que pour un 3+.

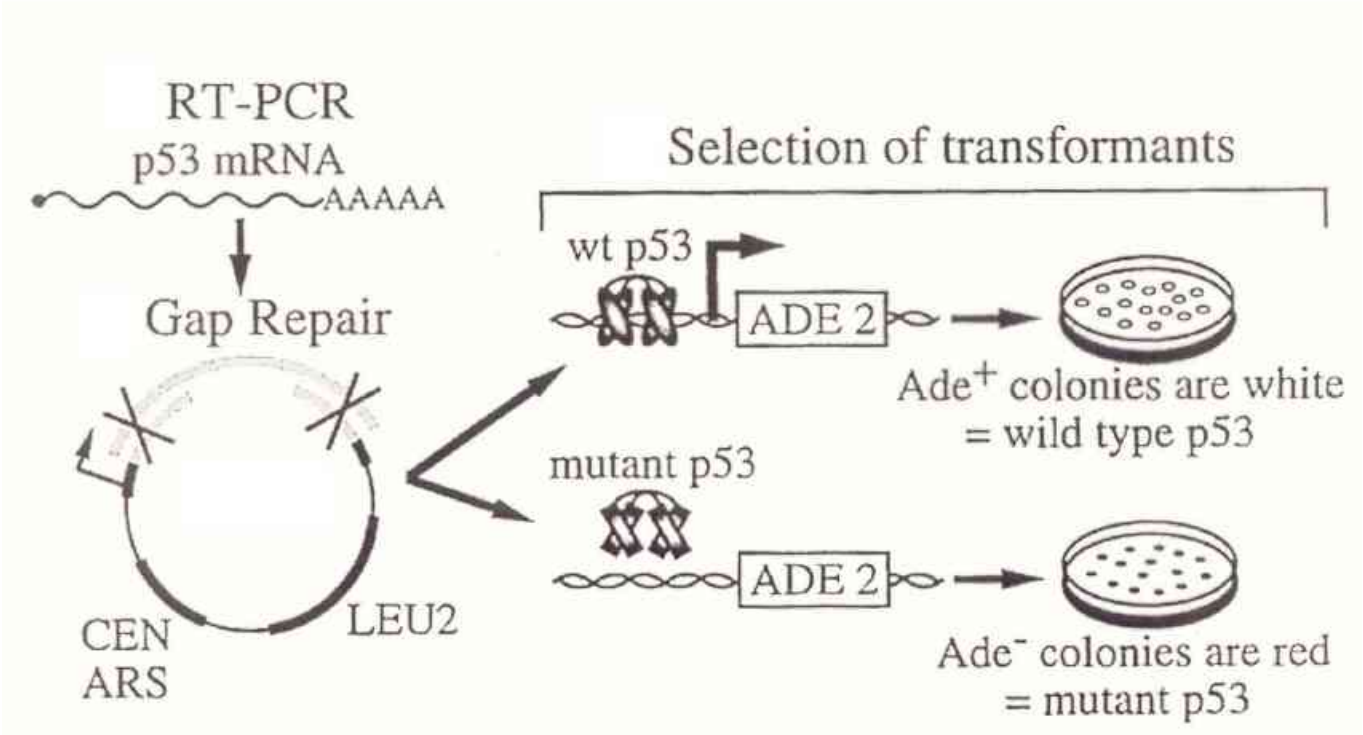
Quand on est confronté à des immunomarquages difficiles (2+), l'anatomopathologie laisse sa place à d'autres types d'analyses pour effectuer une FISH (Fluorescent In Situ Hybridation). Là, on s'intéresse non pas à la protéine membranaire mais au gène HER2. Dans une situation de non amplification, on a un témoin du centromère du chromosome 17 pour voir le rapport entre le nombre de chromosomes (normalement 2) et le nombre de copies de HER2 (plus de 2 si il y a amplification). On identifie tout de suite s'il y a amplification ou non par fluorescence. On détecte une amplification faible ou forte. Cette technique est un gold standard, c'est-à-dire une technique de référence mais elle n'est jamais faite en première intention car elle est très chère.

- TP53

Le troisième marqueur est TP53, molécule essentielle. Quand une cellule est en souffrance et subit un stress hypoxique ou toxique, les mécanismes moléculaires vont tenter de sauver la cellule. P53 en fait partie en essayant de préserver la cellule ou va la faire mourir par apoptose.
Il est muté dans 50% des cancers humains et dans 20 à30% des cancers du sein. L'intérêt est que parmi ces cancers du sein, 50% va répondre complètement à un traitement spécifique : épirubicine-cyclophosphamide.

Comment détecte-t-on cette mutation ?
Par une technique appelée FASAY qui est faite par les biochimistes, c'est une co-transfection dans des levures à partir d'un tissu tumoral congelé. C'est à dire que l'on part de l'ARN messager de P53 qu'on prend dans la tumeur, ils le mettent dans un échantillon de levures et selon que P53 sera normal ou muté les levures vont se développer de manière différente : les unes seront rouges (avec la mutation) et les autres blanches (P53 normal).

Test FASAY, co-transfection dans des levures, à partir de tissu congelé



2.3 Compte-rendu biopathologique complet

Le compte rendu qui prend en compte toutes les données ressemblera à celui-ci :il associe les deux parties de l'étude de l'échantillon : l'anatomopathologie et la biochimie.

Adénocarcinome canalaire infiltrant du sein gauche mesurant 2,3cm, de grade pronostique III (Scarff and Bloom) d'exérèse complète.
Présence de 2 ganglions métastatiques sur un total de 14ganglions.
Stade : PT2, pN1, Mx----------stade 2 (OMS)

RE (récepteurs aux œstrogènes) : négatif
RP (récepteurs à la progestérone) : négatif
HER2 : immunomarquage positif (3+)
Absence de mutation de TP53

On ne donnera pas de traitement anti-œstrogène mais elle surexprime HER2 donc on envisagera l'herceptine et non une chimiothérapie car il n'y a pas de mutations de P53

2.4 Perspectives

On est à a la recherche de nombreux autres marqueurs pour les cancers pour cibler les traitements et prédire la réponse aux traitements. Il existe des techniques moléculaires où on s'intéresse non pas à une seule molécule mais à plusieurs centaines de molécules : c'est ce qu'on appelle une signature moléculaire, qui permettrait de mieux poser les indications pour une chimiothérapie. On cherche la présence ou la surexpression de plusieurs molécules chez de nombreux patients différents afin de retrouver des signatures communes sur lesquelles on pourrait agir.
Dans quelques années, on nous présentera sûrement des profils moléculaires dans des bilans tumoraux, ce ne sera plus uniquement le compte rendu anatomopathologique mais aussi les données moléculaires et biochimiques quant à a la réponse probable du cancer au traitement.

3. Rôle du pathologiste en cours de traitement

Il évalue la réponse thérapeutique afin d'éventuellement adapter les traitements ultérieurs. Pour les multiples cas de cancers du sein avancés (étendu, de grande taille), ils sont traités par une chimiothérapie première, c'est-à-dire avant d'opérer on fait forcément une chimiothérapie car comme on le disait précédemment l'expérience a montré que le pronostic était mauvais si on opérait sans faire de chimio préalable.
On effectue une biopsie avant la chimio où on observe de nombreuses cellules tumorales, puis on fait une autre biopsie après la chimio afin de voir où en sont les cellules tumorales. S'ils en restent c'est que la réponse au traitement a été incomplète. Si on essaie de faire des classifications quant à la réponse au traitement, le seul vrai facteur utile et rassurant pour la patiente c'est de savoir si la réponse a été complète ou non.

4. Conclusion

Seul des échantillons de tissus tumoraux permet un diagnostic précis de cancers, aujourd'hui aucune analyse biologique permet de dire qu'une masse ou une tumeur est un cancer. D'ici une dizaine d'années il sera peut être possible de mettre une carotte contenant du tissu dans une machine pour qu'elle dise de façon sûre que c'est un cancer. Pour l'instant le diagnostic se fait par l'observation macroscopique et morphologique des coupes par l'anatomopathologiste, même si on commence dès maintenant à aller au-delà.
Il faut aussi savoir collaborer avec ses collègues et d'autres laboratoires. La recherche de facteurs pronostics ou prédictifs de réponse à un traitement passe le plus souvent par des analyses complémentaires impliquant le laboratoire de Pathologie et d'autres laboratoires de Biologie Moléculaire. Les labos d'anatomopathologie se sont ouverts aux autres biologistes pour obtenir d'autres informations à propos de l'échantillon étudié.
La réalisation simultanée de prélèvements fixés et congelés devrait être faite à chaque fois que possible afin de permettre la réalisation de ces analyses immédiatement ou dans le suivi des patients. Il faut aussi penser à conserver l'échantillon tissulaire, ne pas le laisser traîner partout et faire en sorte qu'il soit apporté rapidement aux laboratoires d'analyses afin de ne pas le gâcher.

5. Digital microscope

On va parler d'une technologie nouvelle qui va sortir de la pathologie tumorale.
Vous savez que jusqu'a présent, quand on regarde une lame, on utilise un microscope (ce qui vs ferez en D1 en TP). Quand on veut communiquer des infos ou regarder cet échantillon à plusieurs c'est impossible car une seule paire d'yeux peut regarder la lame .Il existe des microscopes où on peut regarder à plusieurs yeux mais ils sont très coûteux et rares.
Il existe une nouvelle technique : le digital microscope qui fait appel à l'informatique. On numérise une image à un très fort grossissement et on fait des milliers de photos qui seront ajoutés à l'ordinateur de façon très rapide pour constituer une lame virtuelle. L'intérêt est qu'on peut observer ces lames sur un ordinateur, par le lien d'Internet partout ou l'on est et à plusieurs.
Vos futures lames de TP et plein d'autres sont disponibles sur
http://virtual-slides.univ-paris7.fr/

Rubrique : enseignement / TP DCEM1

Login : étudiant-DCEM1
Mot de passe : DCEM1

Renseignements : philippe.bertheau@sls.aphp.fr

Petits renseignements sur la spécialité de pathologiste :
Plusieurs d'entre vous auront la chance d'être pathologiste :

Internat 5 ans, assistanat 2 à 4 ans (AHU)

- CHU : MCU-PH, PU-PH, PH
- CLCC : médecin spécialiste
- hôpitaux généraux : PH
- laboratoires privés : cabinets de groupe ++
- centre hôpital et privé : praticien attaché / libéral
- industrie
- diagnostic (<> collègues cliniciens)
- recherche (<> collègues chercheurs, Université, INSERM…)
- enseignement (<> collègues enseignants, Université, FMC

Toutes les diapos sont sur le site de la fac et sur celui de clément, intitulé cancérologie 2. Je me suis permise de changer un peu le plan pour que ce soit un peu plus clair.