

Recommandations d'experts pour la mise en œuvre du dosage du biomarqueur CLDN18.2

Avec l'apparition de nouveaux biomarqueurs dans le cancer de l'estomac et de la jonction gastro-œsophagienne (JGO), il est essentiel que les laboratoires de pathologie connaissent et adoptent les meilleures pratiques en matière de dosage immunohistochimique (IHC).

Élaboré par un comité d'experts en pathologie, ce guide est conçu pour aider les laboratoires à intégrer et maîtriser le dosage de la CLDN18.2.

1

Points clés des recommandations : principes de la validation analytique des dosages IHC^{1,2}

REMARQUE : les recommandations suivantes s'appliquent aux dosages IHC pour le cancer de l'estomac et de la JGO.

RECOMMANDATION 1

Les laboratoires doivent valider tous les dosages IHC avant de les utiliser dans la pratique clinique.

Les lots de validation devraient inclure des résultats d'expression positifs, négatifs et intermédiaires :

- **Contrôle positif** – Tissus contenant l'antigène d'intérêt exprimé à des niveaux supérieurs à un seuil.
- **Contrôle négatif** – Tissus ne contenant pas l'antigène d'intérêt.

Le lot de validation complet ne doit pas être uniquement constitué de tissus normaux.

Les lots de validation doivent refléter l'utilisation prévue du dosage, ainsi que l'indication d'intérêt (p. ex. cancer de l'estomac).

RECOMMANDATION 2

Lors de la validation initiale d'un dosage prévu pour une utilisation clinique, une concordance d'au moins 90 % devrait être atteinte entre le nouveau dosage et le dosage utilisé pour la comparaison.

Si la concordance est inférieure à 90 %, il y a lieu d'en déterminer la cause.

RECOMMANDATION 3

La validation analytique initiale des biomarqueurs prédictifs requiert l'utilisation de 40 cas (20 positifs, 20 négatifs).

Si le pathologiste estime que moins de 40 cas sont suffisants pour la validation, il doit justifier sa décision dans un document.

Les laboratoires peuvent choisir d'utiliser des lots de tissus contenant un nombre de cas supérieur au nombre minimum recommandé.

Si les résultats de la validation ne répondent pas à la norme de concordance de 90 %, il convient de définir la cause de ce résultat et les mesures d'atténuation appropriées à prendre (analyse de tissus supplémentaires, modification des conditions d'analyse).

RECOMMANDATION 4

Dans la mesure du possible, les laboratoires doivent effectuer la validation avec des tissus préparés à l'aide des mêmes méthodes de fixation et de traitement que les cas à analyser en pratique clinique.

Les tissus inclus dans le lot de validation doivent être représentatifs des échantillons qui seront reçus dans la pratique courante.

Le lot de validation doit fournir une gamme représentative de niveaux et de profils d'expression.

RECOMMANDATION 5

Les laboratoires peuvent utiliser des coupes entières, des biopuces tissulaires (TMA) et/ou des micromatrices tissulaires (MMT) dans leurs lots de validation, selon le cas.

Les coupes entières doivent être utilisées si les TMA ou MMT ne sont pas appropriées pour le dosage de l'antigène ciblé ou si le directeur médical du laboratoire ne peut pas confirmer que le processus de fixation et de préparation des TMA et MMT est similaire à celui des échantillons cliniques.

Les TMA ET MMT contiennent plusieurs tissus dont la positivité ou la négativité a été établie préalablement (ce qui permet de comparer les résultats de plusieurs tissus analysés avec un protocole de dosage identique).

Les TMA et MMT présentent des limitations :

- Biomarqueurs présentant des taux élevés d'hétérogénéité (PD-L1, HER2 gastrique).
- Contenu en cellules positives à l'antigène et cellules de contrôle négatives des TMA et MMT généralement moindre que celui des coupes entières en raison de la petite taille de chaque échantillon de tissu.
- Expression dans les TMA (notamment la muqueuse gastrique normale utilisée comme contrôle positif normal) susceptible de ne pas être une représentation fiable de toute la tumeur.
- Expression limitée dans les tissus (p. ex. BCL6).

RECOMMANDATION 6

Lors de la mise en pratique clinique d'un nouveau lot d'anticorps pour un dosage validé existant, les laboratoires doivent confirmer la performance du dosage avec au moins un cas positif connu et un cas négatif connu.

Il est nécessaire de confirmer que la performance du dosage n'a pas changé lors de l'utilisation d'un nouveau lot d'anticorps.

Les laboratoires doivent confirmer la performance du dosage par les modalités suivantes, sans toutefois s'y limiter :

- Fournisseur des anticorps (même clone)
- Dilution des anticorps
- Durées d'incubation ou de démasquage (même méthode)

Il est nécessaire de confirmer que la performance du dosage n'a pas changé en cas de modifications mineures apportées à la méthode de dosage.

Les laboratoires pourraient envisager l'inclusion de tissus présentant une expression positive intermédiaire :

- Il est recommandé d'envisager deux cas positifs (l'un présentant une faible expression et l'autre une forte expression).

RECOMMANDATION 7

Les laboratoires doivent confirmer la performance du dosage par l'analyse d'un nombre suffisant de cas pour s'assurer que les dosages produisent systématiquement les résultats attendus.

Les laboratoires doivent confirmer la performance du dosage en cas de modification de l'un des éléments suivants :

- Type de fixateur
- Méthode de démasquage de l'antigène (c.-à-d. modification du pH, autre tampon, autre équipement thermique)
- Système de détection de l'antigène
- Équipement d'analyse ou de traitement des tissus
- Conditions environnementales de l'analyse (p. ex. réinstallation du laboratoire dans un autre lieu)
- Alimentation en eau du laboratoire

RECOMMANDATION 8

Les laboratoires doivent recommencer le processus complet de validation (équivalent à la validation analytique initiale) lorsque le clone de l'anticorps est modifié pour un dosage validé existant.

RECOMMANDATION 9

Le laboratoire doit documenter toutes les validations et vérifications conformément aux exigences en matière de réglementation et d'accréditation.

2

Composante préanalytique et meilleures pratiques³

MÉTHODE DE TRAITEMENT BRUT
Épaisseur de coupe des échantillons chirurgicaux : ≤ 5 mm
Rapport masse/volume : ≥ 4:1 (optimal : ≥ 10:1)
Température de transport : ambiante
MÉTHODE DE STABILISATION
Type de fixateur : formaldéhyde à 10 % dans un tampon de phosphate à un pH neutre.
Temps passé dans le fixateur : 6 à 24 heures (y compris le temps passé dans le formaldéhyde dans le préparateur de tissus; le temps peut varier selon le type de tissu; p. ex. échantillon chirurgical, biopsie).
VARIABLES DU PRÉPARATEUR DE TISSUS
Programme d’entretien : recommandation du fabricant ou variante validée
Type de paraffine : à bas point de fusion (< 60 °C)
Temps total passé dans le préparateur : 7,5 à 8 heures (interdire les pratiques non standard : p. ex. « immersion dans des solutions non standard »).
GÉNÉRALITÉS
Conditions de stockage à température ambiante (p. ex., entre 20 °C et 25 °C)
Documentation des données pour toutes les recommandations.

3

Préparation des échantillons et considérations d’essai^{4,5}

Les tissus fixés au formaldéhyde et inclus dans la paraffine, préparés en routine, conviennent à une utilisation avec les anticorps primaires – essai de diagnostic in vitro VENTANA CLDN18 (43-14A), anticorps PathPlus™ CLDN18 de LSBio, et anticorps recombinant anti-claudine 18 (43-14A) d’Abcam.
Pour un dosage IHC, il est recommandé d’utiliser des coupes de tissu d’une épaisseur d’environ 4 µm et de les transférer sur des lames en verre chargées positivement.
Avant la coloration, les lames portant les coupes doivent être complètement séchées, soit à température ambiante (séchage à l’air), soit lors d’un chauffage indépendant du processus (dans un four) à 60 °C pendant 60 minutes.
Les lames doivent être colorées rapidement (un délai d’une semaine est recommandé), car l’antigénicité des coupes tissulaires peut diminuer avec le temps et être affectée par des facteurs environnementaux lors d’un stockage prolongé.
Il est recommandé de procéder à un traitement simultané de contrôles positifs et négatifs avec les échantillons inconnus.
Il est recommandé d’inclure des contrôles positifs et négatifs du lot (c.-à-d. des contrôles au niveau du système) avec l’échantillon inconnu.

À propos du comité d’experts sur la CLDN18.2

Le comité d’experts sur la CLDN18.2 est composé de pathologistes parmi les plus renommés au monde. Il est chargé d’élaborer et d’harmoniser les meilleures pratiques visant à l’analyse, l’interprétation et l’établissement de rapports sur l’expression de la CLDN18.2.

Les experts susnommés sont des conseillers contractuels d’Astellas Pharma Inc. et ont reçu une rémunération pour le temps qu’ils ont consacré à cette tâche.



Matteo Fassan, MD, PhD
Padoue, Italie



Takeshi Kuwata, MD, PhD
Tokyo, Japon



Kristina A. Matkowskyj, MD, PhD
Madison, WI, États-Unis



Christoph Röcken, MD
Kiel, Allemagne



Josef H. Rüschhoff, MD
Kassel, Allemagne

Références : 1. College of American Pathologists. IHC assays—New evidence-based guideline for analytic validation (04-01-2004). <https://documents.cap.org/documents/ihc-validation-webinar-handout.pdf>. Consulté le 30 mars 2023. 2. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(11):1432-1443. doi:10.5858/arpa.2013-0610-CP 3. Compton CC, Robb JA, Anderson MW, 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. 4. Essai VENTANA CLDN18 (43-14A) [notice d’emballage]. 5. Jasani B, Schildhaus HU, Tanieri P, et al. Global ring study determining reproducibility and comparability of CLDN18 testing assays in gastric cancer. Affiche présentée lors du congrès ESMO sur les thérapies ciblées 2023; 6 au 8 mars 2023, Paris, France.

BCL6 = proto-oncogène B-cell lymphoma 6, CLDN18 = claudine 18, CLDN18.2 = isoforme 2 de la claudine 18, HER2 = récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain, IHC = immunohistochimie, JGO = jonction gastro-œsophagienne, MMT = micromatrices tissulaires; PD-L1 = ligand de la protéine de mort programmée 1; TMA = biopuces tissulaires.

