

## Validation des méthodes, tests immunohistochimiques PD-L1 dans les Cancers du Poumon Non à Petites Cellules (CPNPC): Laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Ibn Rochd de Casablanca

### [ Validation of methods, PD-L1 immunohistochemical tests in Non-Small Cell Lung Cancers (NSCLC): Laboratory of pathological anatomy of the Ibn Rochd University Hospital in Casablanca ]

Mohamed Belcaid<sup>1,2</sup>, Nadia Anibat<sup>1,2</sup>, Oussama Aazzane<sup>1,2</sup>, Fatima Zahra Bakhtaoui<sup>2</sup>, Saida Stitou<sup>2</sup>, Abdeljalil Rezzak<sup>2</sup>, Nabil Gaougaou<sup>3</sup>, and Mehdi Karkouri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté de médecine et de pharmacie de Casablanca, Université Hassan II de Casablanca, Morocco

<sup>2</sup>Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU Ibn Rochd de Casablanca, Morocco

<sup>3</sup>Département de biologie cellulaire et d'histologie, Faculté de médecine et de pharmacie, Université Ibn Zohr, Laayoune, Morocco

---

Copyright © 2024 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** *Introduction:* The validation of methods aims to satisfy normative requirements; it is among the essential measures for the development of the quality approach which makes it possible to provide proof of the quality of pathological anatomy techniques. **Objective:** Meet normative requirements in terms of validation of techniques, in order to contribute to the progression of the quality approach adopted in our pathological anatomy laboratory. *Materials and methods:* The expression of PD-L1 was carried out by immunohistochemistry using a monoclonal antibody (clone 22C3) on the Dako link 48 platform. Thus, the validation process involves a series of steps: Bibliographic search; description of the method; pre-analytical and analytical risk management; definition of performance criteria to be evaluated and experimental verification. *Results:* The risk analysis allowed us to highlight points for improvement regarding the pre-analytical and analytical phase. In terms of performance verification The results are very satisfactory. The performances of the manual method compared to the automatic technique are: sensitivity (82%), specificity (100%), Kappa coefficient (0.71), Matthew's correlation coefficient (0.76). These results demonstrate that there is agreement between the two methods. *Conclusion:* The performance of our method was in compliance with current standards. Regarding the comparison of methods, the results of the manual method compared to the automated method demonstrated agreement between the two.

**KEYWORDS:** Lung cancer, quality approach, method validation, PDL1 test, internal quality control.

**RESUME:** *Introduction:* La validation des méthodes vise à satisfaire des exigences normatives, elle figure parmi les mesures essentielles du développement de la démarche qualité qui permet d'apporter la preuve de la qualité des techniques d'anatomie pathologique.

**Objectif:** Répondre aux exigences normatives en terme de validation des techniques, afin de contribuer à la progression de la démarche qualité adoptée dans notre laboratoire d'anatomie pathologique. *Matériels et méthodes:* L'expression du PD-L1 a été réalisée par l'immunohistochimie à l'aide d'un anticorps monoclonale (clone 22C3) sur la plateforme Dako link 48. Ainsi, Le processus de validation, implique une série d'étapes: Recherche bibliographique; description de la méthode; maîtrise des risques pré-analytique et analytique; définition des critères de performances à évaluer et vérification expérimentale. *Résultats:* L'analyse des risques nous a permis de mettre en évidence les points à améliorer concernant la phase pré-analytique et analytique. En terme de vérification des performances Les résultats sont très satisfaisants.

Les performances de la méthode manuelle par rapport à la technique sur automate sont: la sensibilité (82%), la spécificité (100%), Le coefficient Kappa (0,71), le coefficient de corrélation de Matthew (0,76). Ces résultats démontrent qu'il y a une concordance entre les deux méthodes. *Conclusion:* Les performances de notre méthode étaient en conformité avec les normes en vigueur. Concernant la comparaison des méthodes, les résultats de la méthode manuelle par rapport à la méthode automatisée ont démontré une concordance entre les deux.

**MOTS-CLEFS:** Cancer du poumon, démarche qualité, validation des méthodes, test PDL1, contrôle qualité interne.

## 1 INTRODUCTION

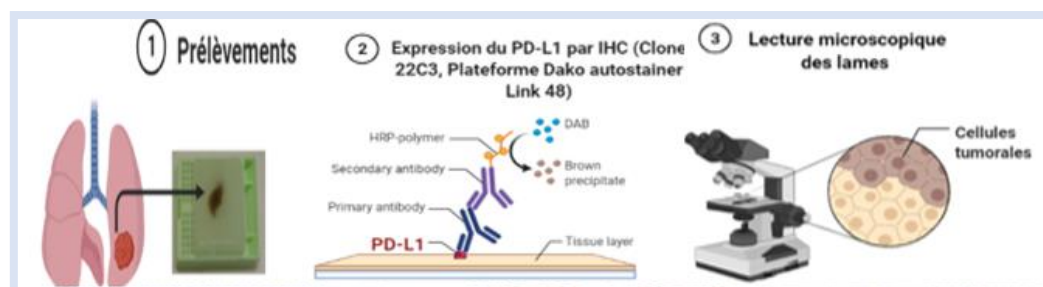
La validation des méthodes occupe une place centrale dans l'évolution de la démarche qualité au sein d'un laboratoire elle vise à satisfaire des exigences réglementaires et aussi normatives [1]. Cette initiative s'inscrit dans le contexte de la recherche constante de la conformité à la norme ISO 15189: « Le laboratoire doit utiliser uniquement des procédures validées pour s'assurer qu'elles conviennent à l'utilisation prévue. Les validations doivent être aussi approfondies que nécessaire pour répondre aux besoins de l'application ou du domaine d'application concerné (e). Le laboratoire doit enregistrer les résultats obtenus et la procédure utilisée pour la validation. » [2].

L'IHC du test PD-L1 permet de déterminer le niveau d'expression de PD-L1, ce qui peut guider les décisions thérapeutiques, notamment en ce qui concerne l'utilisation des inhibiteurs de PD-1/PD-L1. La validation de cette technique est essentielle pour garantir la fiabilité des résultats du test.

Dans le but d'améliorer continuellement nos pratiques en laboratoire, nous avons entamé une démarche de validation de la technique IHC du test PD-L1.

## 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

**2.1 EXPRESSION IHC DU PD-L1:** est un test immunohistochimique semi-quantitatif en utilisant un anticorps monoclonal anti-PD-L1 (clone 22C3) destiné à la détection de la protéine PD-L1 dans les CBNPC fixés au formol et inclus en paraffine.



**Fig. 1. Examen IHC: PD1/PDL1**

Cette technique est réalisée à l'aide de l'autostainer Link 48. L'expression de PD-L1 est déterminée par TPS (Tumor Proportion Score), c'est le pourcentage de cellules tumorales viables présentant une coloration partielle ou complète de la membrane, par rapport à toutes les cellules tumorales viables présentes dans la lame (positives et négatives). Pour l'évaluation du PD-L1, il faut au moins 100 cellules tumorales viables doivent être présentes dans l'échantillon. Sur la base de l'expression de PD-L1, les cellules tumorales ont été classées en trois groupes: Expression négative (TPS<1%), faible expression (TPS 1-49%) et forte expression (TPS≥50%).

Le contrôle qualité interne en immunohistochimie est crucial pour assurer la validité continue des techniques et la fiabilité des résultats du test PD-L1. Ce processus implique l'utilisation de témoins de contrôle, tels que des témoins positifs et négatifs, pour confirmer la précision de la méthode. Un témoin positif exprime l'antigène recherché, confirmant le bon déroulement de la réaction, tandis qu'un témoin négatif, qui ne présente pas l'antigène, vérifie la spécificité de la réaction. Une fiche de contrôle est établie pour chaque étape de la technique, avec la lecture des témoins spécifiques. Deux éléments de contrôle essentiels sont examinés de près. Le témoin interne, l'amygdale, est utilisé comme repère interne pour valider la phase pré-analytique. Si positif, il confirme la validation du processus; s'il est négatif, la technique est considérée comme invalide. Le témoin externe, une lignée cellulaire, agit comme un témoin analytique. Un scénario positif/négatif suggère une dégradation de l'antigène pendant la phase pré-analytique, tandis qu'un scénario négatif/négatif indique un dysfonctionnement dans le système de détection. En utilisant également des témoins négatifs, cette rigueur de contrôle assure la fiabilité et la précision de l'évaluation de l'expression du PD-L1, garantissant des résultats sûrs et une prise en charge optimale des patients.

## 2.2 ETAPES DE LA VALIDATION DE METHODE

### 2.2.1 ANALYSE DES RISQUES LIES À LA PHASE PRE-ANLYTIQUE ET ANALYTIQUE DU TEST IMMUNOHISTOCHIMIQUE PDL1/PD1

Notre démarche consiste à examiner les risques associés au processus pré-analytique et analytique du test PDL1. Nous avons choisi de mettre en œuvre deux méthodes spécifiques. Tout d'abord, nous avons utilisé diagramme de cause à effet comme premier outil d'analyse. Cette méthode nous a permis d'identifier les points critiques à surveiller tout au long des différentes étapes du processus qui nécessitent une maîtrise particulière.

En complément, nous avons mis en place la méthode Analyse Des Risques en tant que deuxième approche d'évaluation des risques. Cette méthode nous a aidés à définir des modalités de maitrise pour éviter leur survenue.

### 2.2.2 DETERMINATION DES PARAMETRES DE LA VALIDITE ANALYTIQUE

Tous les échantillons ont été soumis aux anticorps 22C3, conformément aux protocoles établis par le fabricant. Le choix des paramètres de performance spécifiques à une méthode donnée doit être déterminé avant toute expérimentation. Cela peut être basé sur les recommandations d'organisations professionnelles, de publications scientifiques, de normes nationales et internationales, ainsi que sur les informations fournies par le fournisseur [2.3]

Les paramètres d'évaluation de la performance analytique du test IHC PDL1, pris en considération:

#### ➤ Fidélité

Elle se réfère à la capacité d'une méthode d'analyse ou de mesure à produire des résultats cohérents et reproductibles lorsque le même échantillon est analysé à plusieurs reprises.

- La répétabilité: évalué la répétabilité par l'analyse des lames des mêmes patients dans les mêmes conditions, même opérateur et même cycle, comparaison de 5 paires de lames issues de 5 blocs, en analysant 10 lames au totale, deux lames par bloc et par cycle.
- Reproductibilité: Evaluer la fidélité intermédiaire par l'analyse des mêmes échantillons de 5 paires de lames issues de 5 blocs, en analysant 10 lames au totale, deux lames par bloc et chacune dans un cycle différent.

#### ➤ Robustesse

La robustesse d'une procédure d'analyse mesure sa capacité à ne pas être affectée par de légères variations délibérées des paramètres de la méthode. Elle indique la fiabilité de la méthode dans des conditions normales d'utilisation. Ces variations légères correspondent à des écarts par rapport aux valeurs nominales définies dans la méthode [4].

L'étude de la robustesse a été réalisée en prenant en compte les paramètres suivants:

#### • Fixation

Agent fixateur: Le formol tamponné à 10%, il est l'agent fixateur recommandé pour les analyses en immunohistochimie, notamment celles portant sur le test PDL1. Cette solution permet de préserver efficacement les échantillons tissulaires et leurs caractéristiques moléculaires [5].

Durée de fixation: Dans notre laboratoire, la durée de fixation habituelle est de plus de 6 heures pour les échantillons biopsiques, tandis que pour les pièces opératoires elle est généralement entre 24 à 72 heures.

- Épaisseur de coupe: Les coupes sont réalisées à une épaisseur entre 3 et 5 microns (recommandé par le fabricant)
- Mode de séchage des coupes histologique: Mode de séchage des coupes histologiques: Durée et température on a utilisé 3 lames (65°C pendant une heure; 65°C pendant une heure suivie d'une nuit de séchage à 37°C; une nuit entière à 37°C)
- Délai entre la production et l'utilisation des coupes (3 lames issues du même bloc)

Pour la conservation des lames après la coupe au réfrigérateur (entre +4C). Nous avons découpé et examiné 3 lames issues du même bloc, conservées au réfrigérateur, et les avons examinées aux jours (J1, J15 et J40).

#### ➤ Hétérogénéité de l'expression du PDL1

En ce qui concerne l'hétérogénéité de l'expression du gène PDL1 par les cellules tumorales du même patient, nous avons exploré si l'expression du PDL1 reste constante à travers différents sites anatomiques. Pour cela, nous avons utilisé quatre échantillons prélevés

chez un unique patient: deux proviendront de sites tumoraux distincts et les deux autres seront issus de métastases ganglionnaires. Cela se traduira par la préparation de quatre lames au total, chacune correspondant à un échantillon spécifique.

### 2.2.3 COMPARAISON DES MÉTHODES

La comparaison entre la méthode manuelle et la méthode automatisée de référence employée au laboratoire, a pour objectif d'évaluer la précision et la **justesse** de la technique manuelle. À cet effet, nous avons mis en œuvre une expérience avec 64 lames provenant de 32 échantillons distincts. Chacun de ces échantillons a donné ainsi lieu à deux lames, l'une examinée à l'aide de l'automate et l'autre analysée manuellement. Ces 32 paires de lames ont servi de base à notre comparaison approfondie pour déterminer la justesse et la précision de la technique manuelle par rapport au test de référence utilisé sur automate au laboratoire pour évaluer les performances diagnostique des deux techniques, nous avons calculé La sensibilité, la spécificité et les autres variables voir tableau des formules

**Analyse statistique:** Le tableau 1 représente les formules de calcul statistique utilisées afin de déterminer les performances diagnostiques des 2 techniques " manuelle" et " automatisée".

*Tableau 1. Formules de variables de concordance*

Symboles	Formules
La sensibilité (Se) (%)	$VP/(VP+FN)$
La spécificité (Sp) (%)	$VN/(VN+FP)$
La précision diagnostic (%)	$(VP+VN) / T$
La valeur prédictive positive (VPN) (%)	$VP/(VP+FP)$
La valeur prédictive négative (VPN) (%)	$VN/(VN+FN)$
Indice de YODEN (Y)	$Se+Sp-1$
Rapport de vraisemblance (RV) %	$Se/(1-Sp)$
Coefficient Kappa (K)	$(Po-Pe) / (1-Pe)$
Coefficient de corrélation de Mathew (MCC)	$(VP*VN) - (FP*FN) / \sqrt{[(VP+FP) (VP+FN) (VN+FP) (VN+FN)]}$

## 3 RÉSULTATS ET ANALYSE

### 3.1 ANALYSE DES RISQUES PRE-ANALYTIQUE ET ANALYTIQUE DE LA TECHNIQUE IHC PDL-1

L'analyse des facteurs d'influence majeurs a été déterminé en utilisant le diagramme de causes et effets ou diagramme des 5 M (Main d'œuvre, Matériels, Matière, Méthodes, Milieu) influencent la qualité de l'IHC comme illustré dans la figure 2.

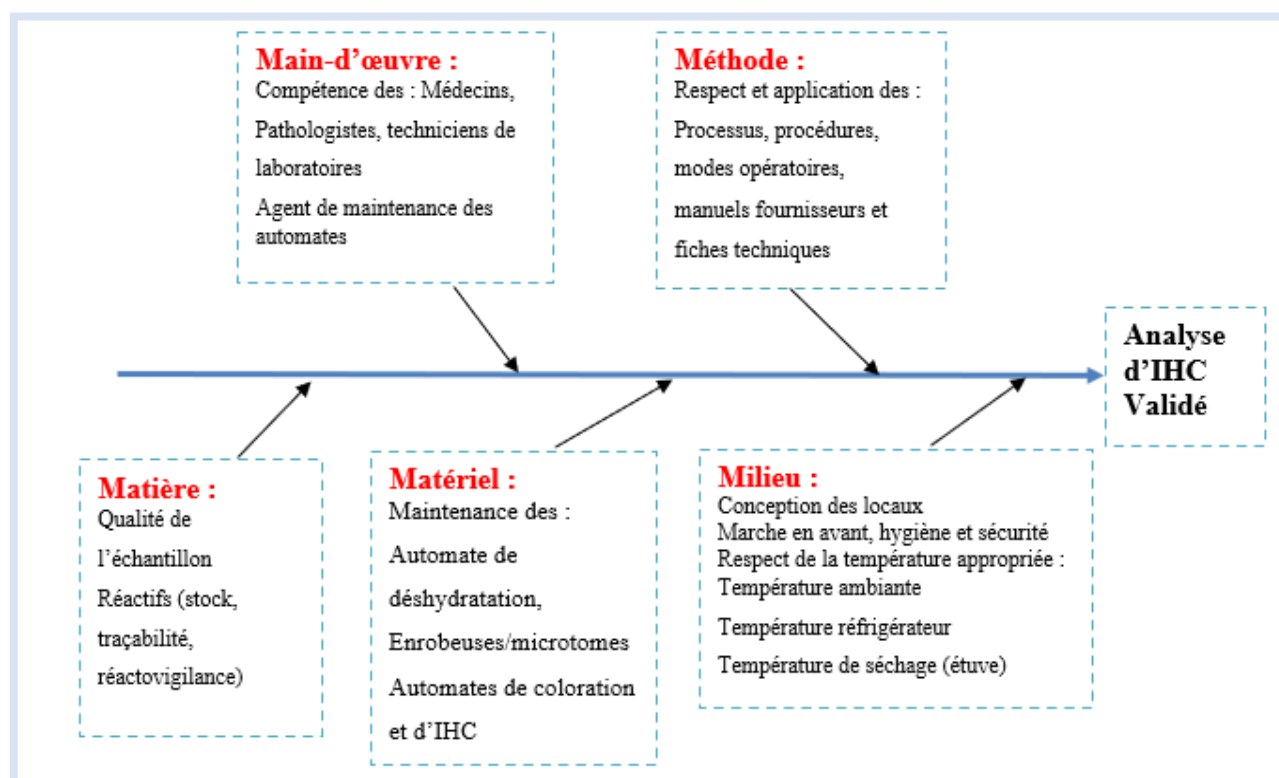


Fig. 2. Diagramme de causes et effets pour l'analyse IHC

En ce qui concerne les résultats de l'analyse des risques liés au test PDL1 ils se résument sur les tableaux 2 et 3:

Tableau 2. Maîtrise des risques de la phase pré-analytique

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<p><b>Matière :</b> Type d'échantillon : - Echantillon tissulaire fixé ou non fixé. - Blocs en paraffine ou lames blanches de tissus.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Qualité de l'échantillon (conditionnement, orientation, encrage...)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manuel de prélèvement</li> <li>- Echanges avec les prescripteurs</li> </ul>
<p><b>Main d'œuvre :</b> (Compétences du personnel)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formation (initiale et continue) du personnel</li> <li>- Suivi des compétences</li> <li>- Qualification/Habilitation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Expression des besoins en formation du personnel</li> <li>- Evaluation des Pratiques Professionnelles</li> <li>- Formations continue</li> </ul>
<p><b>Matériels ;</b> Réactif  Equipements : Exigences métrologiques  Automates :</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gestion des stocks de réactifs</li> <li>- Traçabilité</li> <li>- Gestion des risques chimiques liés à certains réactifs</li> <li>- Instrument de mesures</li> <li>- Utilisation et entretien corrects de l'automate</li> <li>- Maintenances préventives et curatives</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maîtrise des stocks</li> <li>- Traçabilité des lots et dates de péremptions</li> <li>- Mise en place de moyens de prévention collectifs et individuels.</li> <li>- Fiches de données de sécurité des réactifs.</li> <li>- Etalonnage systématiques des instruments</li> <li>- Gestion des maintenances curatives matériels</li> <li>- Manuel d'instruction de l'automate</li> <li>- Formation des techniciens sur site à la manipulation et l'entretien des appareils</li> <li>- Habilitation des techniciens au poste de travail</li> <li>- Fiche de vie avec suivi des interventions préventives et curatives</li> </ul>

<p><b>Méthodes :</b></p> <p>Prelevement</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Transport</li> <li>- Réception</li> <li>- Enregistrement</li> <li>- Examen à l'état frais</li> <li>- Fixation</li> <li>- Examen macroscopique fixé</li> <li>- Déshydratation</li> <li>- Enrobage</li> <li>- Coupe au microtome</li> </ul> <p>Séchage</p>	<p>A toutes les étapes :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gestion des stocks, des réactifs et consommables.</li> <li>- Identitovigilance</li> </ul> <p>Transport :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conditions de transport</li> <li>- Durée du transport / Délai de fixation</li> </ul> <p><b>Réception :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identitovigilance</li> <li>- Concordance entre le nombre de pots et le nombre d'examens demandés et concordance des numérations.</li> </ul> <p><b>Enregistrement :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Risque d'intervertir des prélèvements</li> </ul> <p><b>Macroscopie :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identitovigilance</li> <li>- Ciblage et épaisseur des échantillons sélectionnés</li> <li>- Risque de contamination inter-échantillons</li> <li>- Erreur de numérotation des cassettes et/ou perte d'une cassette</li> </ul> <p><b>Fixation :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quantité de formol dans le pot du prélèvement et dans le bac du panier à cassettes.</li> <li>- Qualité de la fixation (risque de pièce insuffisamment fixée)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maîtrise des stocks, alcool, formol tamponné, paraffine, lames jetables de microtome, cassettes.</li> <li>- Stockage de la paraffine fondue dans une étuve avec surveillance de la température.</li> <li>- Vérification à toutes les étapes du processus de la concordance entre le nom du patient, le nombre de pots, le nombre d'examens demandés et la numérotation des pots, des blocs de paraffine, des lames</li> <li>- Gestion des événements indésirable.</li> <li>- Identification et maîtrise des non conformités.</li> <li>- Recommandation sur les conditions de transport (température, délais maximum, conditionnement) Manuel de prélèvement et référentiel des analyses de biologie du cancer</li> <li>- Bons de demande d'examen anatomo-pathologique comportant la date et l'heure de prélèvement et la date et heure de fixation.</li> <li>- Vérification du nom, du numéro d'identification du patient et de la concordance des numérotations.</li> <li>- Prise en charge des demandes d'examens par le département de biologie du cancer</li> <li>- Modalités de signalement et gestion d'un évènement indésirable</li> <li>- Identification et maîtrise des non conformités</li> <li>- Fiche de traçabilité des écarts liés à l'identitovigilance</li> <li>- Enregistrement et élaboration d'étiquettes autocollantes</li> <li>- Etiquetage soigneux sur le récipient avec vérification de la concordance de numérotation.</li> <li>- Guide et fiches de macroscopie des pièces opératoires.</li> <li>- Nettoyage de la paillasse et nettoyage ou changement de matériel entre chaque patient.</li> <li>- Vérification tracée par une autre personne du nombre de cassettes réalisées pour chaque patient à la fin de la macroscopie.</li> <li>- Vérification de la concordance d'identité et de numérotation lors de la mise en cassette.</li> <li>- Vérification du volume de fixateur : au minimum 5 fois le volume du prélèvement et taille du récipient adaptée.</li> <li>- Immersion complète des cassettes dans le bac à cassettes lors de la macroscopie.</li> <li>- Contrôle de la durée de fixation avec la date et l'heure de fixation notées sur le bon de demande d'examen</li> <li>- Sélection quotidienne des pièces suffisamment fixées pour examen macroscopique ;</li> <li>- Feuille de paillasse : macroscopie pièce fixée</li> </ul>
---	---	---

	<p><b>Déshydratation :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation et maintenance des automates de déshydratation</li> <li>- Inversion lors du changement des réactifs</li> <li>- Cycle de déshydratation : Programmation de l'automate et lancement du cycle</li> </ul> <p><b>Enrobage :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation et maintenance des enrobeuses</li> <li>- Contamination inter-échantillon ou perte d'un échantillon</li> </ul> <p><b>Coupe, étalement et séchage :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation et entretien des microtomes</li> <li>- Identitovigilance</li> <li>- Epaisseur de coupe</li> <li>- Coupe plissée</li> <li>- Coupe striée (lame de microtome défectueuse,</li> <li>- Coupe incomplète (dégrossissage insuffisant)</li> <li>- Phase possible de contamination</li> </ul> <p><b>Séchage :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Séchage des lames dans une étuve à 60°</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle de la fixation à chaque prise en charge d'un prélèvement.</li> <li>- Maintenances préventives des automates de déshydratation</li> <li>- Traçabilité des changements de réactifs dans le cahier de vie de chaque automate.</li> <li>- A chaque changement de réactif : passage d'un bloc témoin pour chaque automate. Ces blocs témoins sont enrobés, coupés et colorés en premier et font l'objet d'une validation technique tracée.</li> <li>- Le choix du cycle est effectué en fonction de la taille des spécimens (grandes ou petites).</li> <li>- Les cassettes sont ouvertes et enrobées les unes après les autres pour éviter tout mélange entre les échantillons.</li> <li>- Un nettoyage des pinces est réalisé entre chaque échantillon pour éviter toute contamination.</li> <li>- L'enrobage des biopsies s'effectue en premier. Mode opératoire enrobage et coupe des blocs de paraffine</li> <li>- Maintenance préventive. Mode opératoire enrobage et coupe des blocs de paraffine</li> <li>- Vérification de la numérotation et de la correspondance avec chaque bloc est faite lors de la coupe de celui-ci.</li> <li>- Vérification de l'épaisseur de coupe au niveau de l'affichage du microtome (3à5 µm)</li> <li>- Vérifie de la température du bain marie.</li> <li>- Renouvellement régulier des lames de microtome</li> <li>- Nettoyage du bain-marie entre chaque coupe pour récupérer toute paraffine résiduelle à la surface de l'eau, évitant ainsi une contamination entre échantillon.</li> <li>- Surveillance de la température des enceintes de l'étuve.</li> <li>- Le temps de séchage est adapté en fonction de la taille des lames.</li> </ul>
<p><b>Milieu :</b> Conditions d'hygiène requises</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nettoyage</li> <li>- Désinfection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hygiène et sécurité du milieu des risques chimiques et infectieux</li> </ul>

Tableau 3. Maîtrise des risques de la phase analytique du test PDL1

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<b>Main d'œuvre :</b> Habilitation du personnel	- Formation (initiale et continue) du personnel Suivi des compétences Qualification/Habilitation	-Maîtrise des compétences
<b>Matière :</b> Lames blanches de tissus.	Conservation des lames blanches	Conservation des lames blanches au réfrigérateur entre 2 et 6°C
<b>Matériels :</b> -Exigences métrologiques - Gestion des réactifs - Exigences informatiques spécifiques - Automates d'IHC:	- Etalonnage, utilisation et entretien correct des instruments - Gestion des stocks, des réactifs - Maintenance préventive et curative	- Fiche de vie avec suivi des interventions préventives et curatives. - Maîtrise de la gestion des stocks des réactifs et des anticorps - Procédure de maintenance - Préventive et curative
<b>Méthode :</b> Préparation des lames : Coupe, étalement et séchage Démasquage, déparaffinage, réhydratation. Technique sur automate  Coloration de la lame :	- Identitovigilance - Coupe des lames - Séchage des lames - Qualité de la solution dans le PT Link - Protocole technique <u>Coloration d'aucune lame :</u> - Réactifs n'ont pas été utilisés dans l'ordre ou adéquatement ; -Chauffage excessif des coupes de tissus montés, avant déparaffinage et démasquage des antigènes par la chaleur <u>Coloration faible des lames :</u> - Méthode de fixation inappropriée. - Mauvaise restauration de l'épitope. - Chauffage excessif des coupes de tissus montées. <u>Coloration de fond excessive des lames</u> <u>Tissu se détache des lames</u> <u>Coloration spécifique trop forte</u> <u>Faux négatif :</u> Dégradation de l'antigène dans le tissu ; Défaillance du système de révélation	- Vérification de la numérotation et de la correspondance avec chaque bloc - Surveillance de la température des enceintes de l'étuve. - Séchage : une heure à 65°C plus une nuit à 37°C - Réalisation des coupes de 3à5µm - Renouveler la solution et nettoyer les bords des bacs régulièrement - Lancer la technique selon les directives du fabricant - Respect des étapes de la contre coloration - Respecter les T° et les durées appropriées - Eliminer une surfixation - Respecter les T° et les durées appropriées - Respecter les instructions de la procédure de coloration - Vérifier la méthode de fixation - Respecter les instructions de la procédure technique - Vérifier la méthode de fixation ; utiliser des lames salinisées  - Méthode de fixation, restauration de l'épitope ; solution de lavage appropriées. - Respect des protocoles pré-analytique et analytique
<b>Milieu :</b> Conditions d'hygiène	Nettoyage des locaux	Mise en place des procédures d'hygiène et de sécurité

### 3.2 ANALYSE DES RÉSULTATS

Cette analyse des risques a mis en lumière les points critiques ainsi que les modalités de maîtrise nécessaires à la fois dans la phase pré-analytique et analytique.

En ce qui concerne la phase pré-analytique, il est essentiel de souligner son impact sur la qualité ultérieure des techniques d'immunohistochimie et, par conséquent, sur la détection de PD-L1 par IHC [5, 6]. Chacune de ces étapes revêt une importance capitale et doit être soumise à des contrôles et des procédures de maîtrise rigoureuse. Parmi les éléments à prendre en compte, la méthode de fixation (le rapport entre le volume de fixateur et la pièce, le choix du récipient approprié, et les mesures de protection) revêt une importance capitale. Il est vivement recommandé de minimiser autant que possible la durée d'ischémie froide des échantillons tissulaires. L'ischémie froide est définie comme le laps de temps écoulé entre l'extraction du prélèvement tissulaire du corps humain et son immersion dans le fixateur. Tout retard de fixation dépassant une heure a un impact significatif sur la détection des marqueurs immunohistochimiques [7, 8].

Il convient de noter que le formol tamponné à 10 % est le fixateur recommandé. Par ailleurs, il est impératif de s'assurer que le volume de fixateur utilisée est suffisant. En ce qui concerne le temps de fixation, il doit être d'au moins 6 heures pour les biopsies, afin d'éviter toute sous-fixation irrémédiable, et ne doit pas dépasser 72 heures pour les pièces opératoires [9, 10]. De plus, l'utilisation d'une



paraffine ayant un point de fusion bas, idéalement inférieur à 60 °C, est fortement préconisée [10]. Enfin, il est essentiel de prévoir une évaluation préliminaire de la quantité de cellules tumorales lors de la coloration standard HE, car cette étape est indispensable à toute interprétation précise.

#### Concernant l'étape analytique

Pour garantir le succès de la technique, il est impératif de suivre rigoureusement le protocole de coloration immunohistochimique PD-L1 IHC 22C3 standardisé par le fabricant. Chaque étape de ce protocole doit être exécutée avec une grande précision.

Pour suivre les directives établis par les sociétés savantes afin de réussir la phase pré-analytique de l'immunohistochimie, il faut appliquer les recommandations spécifiques établies par le Groupe d'Étude des Facteurs Pronostiques Immunohistochimiques dans le cancer du sein (GEFPICS) [11], à prendre en compte et qui peuvent également s'appliquer à d'autres marqueurs tumoraux:

### 3.3 MISE EN PRATIQUE DE LA VALIDATION APPLIQUEE À L'IMMUNOHISTOCHEMIE

#### 3.3.1 LECTURE ET INTERPRÉTATION

Chaque lame a été lue par le chef de service pour obtenir la valeur de l'expression de la protéine PD-L1 par les cellules tumorales, permettant en suite de regrouper les résultats en trois catégories distinctes:

- Moins de 1%
- Entre 1% et 49%
- 50% ou plus

Ces catégories définissent les seuils auxquels une immunothérapie peut être envisagée, L'immunothérapie avec le médicament pembrolizumab est envisagée en deuxième ligne pour les cas présentant une expression de PD-L1 comprise entre 1% et 49%, tandis qu'elle est envisagée en première ligne pour les cas où cette expression est égale ou supérieure à 50%.

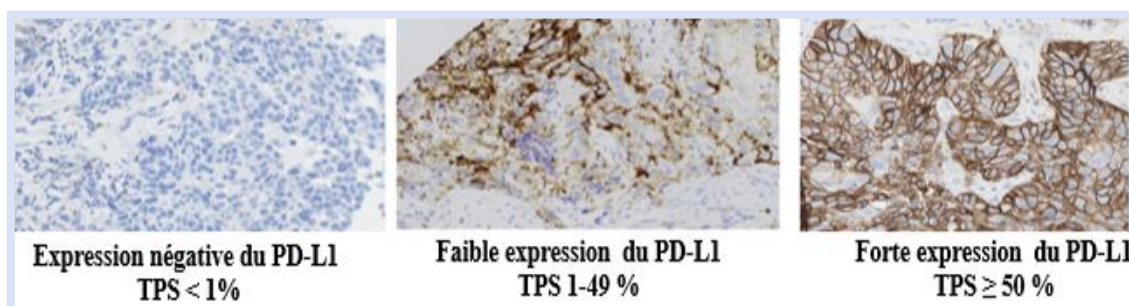


Fig. 3. Expression PDL1 par les cellules tumorales

#### 3.3.2 RÉSULTATS DES PARAMÈTRES ÉTUDIÉS

##### ➤ Compétences médicales et techniques

Il convient de souligner que la réalisation du test PDL1 est effectuée spécifiquement par deux docteurs biologistes formées pour le poste d'immunohistochimie. Aucune disparité en termes de performance entre elles n'a jamais été constatée de façon rétrospective. En outre, la lecture et l'interprétation des résultats sont assurées par le chef de service, afin de garantir la plus grande précision et qualité dans l'analyse des résultats.

##### ➤ Conservation de la qualité des réactifs

La gestion des réactifs, y compris les anticorps, les réactifs de coloration et d'autres produits chimiques, est effectuée conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et aux exigences normatives.

Le respect également des consignes du fournisseur est primordial lorsqu'il s'agit de gérer le stockage, la préservation et l'utilisation des réactifs. Il est essentiel de suivre scrupuleusement les recommandations inclus dans le mode d'emploi de ces produits afin de garantir la qualité et la sécurité de nos opérations.

Pour détecter l'expression de l'anticorps anti-PD-L1 dans le cancer du poumon, nous avons utilisé un Kit validé de Dako (Kit PD-L1 IHC 22C3 PharmaDx, anticorps monoclonal anti-PD-L1 cloné 22C3 avec système de visualisation EnVision FLEX). Ce Kit fournit tous les

réactifs nécessaires (prêts à l'emploi) pour l'immunohistochimie classique. Des lames témoins incluant des lignées cellulaires positives et négatives pour l'anticorps anti-PD-L1 sont également incluses dans le Kit.

➤ La répétabilité

Nous avons évalué la répétabilité par l'analyse des lames des mêmes patients dans les mêmes conditions, même opérateur et même cycle, comparaison de 5 paires de lames issues de 5 blocs, en analysant 10 lames au totale, deux lames par bloc et par cycle.

**Tableau 4. Evaluation de la répétabilité du test PDL1**

Blocs	Lames	Cycles	TPS
Bloc 1	Lame 1	Cycle 1	50%
	Lame 2		50%
Bloc 2	Lame 1	Cycle 2	30%
	Lame 2		30%
Bloc 3	Lame 1	Cycle 3	10%
	Lame 2		10%
Bloc 4	Lame 1	Cycle 4	70%
	Lame 2		70%
Bloc 5	Lame 1	Cycle 5	20%
	Lame 2		20%

Cette analyse a démontré que l'expression est la même chez les lames de chaque bloc, révélant ainsi qu'il y a une répétabilité intra-cycle.

➤ Reproductibilité

Evaluer la fidélité intermédiaire par l'analyse des mêmes échantillons dans des cycles différents en utilisant les lames des mêmes blocs.

Nous avons effectué une analyse comparative des données issues de dix lames provenant de cinq blocs distincts. Plus précisément, nous avons examiné chaque lame de chaque bloc, lors de dix séries distinctes. Les résultats obtenus se présentent dans le tableau 21:

**Tableau 5. Etude de la reproductibilité du test PDL1**

Blocs	Lames	Cycle	TPS
Bloc 1	Lame 1	Cycle 1	20%
	Lame 2	Cycle 2	20%
Bloc 2	Lame 1	Cycle 3	50%
	Lame 2	Cycle 4	50%
Bloc 3	Lame 1	Cycle 5	10%
	Lame 2	Cycle 6	10%
Bloc 4	Lame 1	Cycle 7	70%
	Lame 2	Cycle 8	70%
Bloc 5	Lame 1	Cycle 9	5%
	Lame 2	Cycle 10	5%

Cette analyse démontre que l'expression est la même chez les lames de chaque bloc, révélant ainsi qu'il y a une reproductibilité inter-cycle.

➤ Mode de séchage des coupes histologique

Trois lames, toutes issues du même bloc, ont été soigneusement sélectionnées pour cette expérimentation. Chaque lame a été soumise à des conditions de traitement spécifiques, ce qui a permis d'obtenir des résultats variés et instructifs.

Pour la première lame, nous avons utilisé une température de 65°C pendant une heure. L'analyse a donné une expression de 20%, bien que la coloration fût légèrement moins intense.

La deuxième lame a subi un traitement thermique similaire, avec une température de 65°C pendant une heure, suivie d'une nuit de séchage à 37°C. Cette analyse a donné un résultat évalué à 20% avec une bonne intensité.

Quant à la troisième lame, elle a été conservée à une nuit complète à une température constante de 37°C. Le résultat de cette troisième étape a donné un résultat similaire, évaluée également à 20%, bien que la coloration fût légèrement moins intense.

**Tableau 6. Impact de la température et le temps de séchage sur l'expression PDL1**

Bloc	Lames	Température de séchage	TPS	Intensité du signal
Bloc	Lame 1	65°C	20%	Moins intense
	Lame 2	65°C plus 37°C pendant une nuit	20%	Bonne intensité
	Lame 3	37°C pendant une nuit	20%	Moins intense

Ainsi, bien que les trois échantillons aient tous produit une expression de 20%, la différence constatée concerne leurs intensités. Ces variations mettent en évidence l'importance de mener des études avec un échantillonnage important, permettant ainsi une meilleure évaluation de ces variations.

➤ **Durée de conservation des lames**

Nous avons découpé trois lames provenant d'un même bloc. Ces lames ont été conservées à une température de +4°C dans un réfrigérateur et manipulées à trois moments distincts: J1, J15 et J40.

Les analyses menées sur ces lames ont donné les résultats suivants:

- La première lame, effectuée à J1, a affiché une expression de 20%.
- La seconde lame, manipulée à J15, a révélé une expression de 5%.
- La troisième lame, réalisée à J40, a également révélé une expression de 5%.

**Tableau 7. Durée de conservation des lames**

Bloc	Lames	Durée de conservation	TPS
Bloc	Lame1	J1	20%
	Lame2	J15	5%
	Lame3	J40	5%

Il est à noter que malgré les variations observées dans le pourcentage de cellules tumorales, passant de 20% à 5%, l'expression de ces trois lames est restée constamment entre 1% et 49%. Ces variations relatives pourraient être attribuées, en plus des variations temporelles, soit à une utilisation excessive qui a épuisé le matériel tissulaire ou à l'hétérogénéité de la matière tumorale.

➤ **Hétérogénéité intra-tumorale**

Nous avons utilisé quatre échantillons prélevés chez un unique patient: deux proviendront de sites tumoraux distincts (D, E) et les deux autres seront issus de métastases ganglionnaires (I, H). Donc nous avons préparé quatre lames correspondant aux quatre blocs spécifiques. Les résultats obtenus se présentent comme suit: Lame du bloc D: 20%; lame du bloc E: 30%; lame du bloc I: 10%; lame du bloc H: <1%.

**Tableau 8. Hétérogénéité intra-tumorale**

Blocs	Lames	TPS
Bloc D	Lame1	20%
Bloc E	Lame2	30%
Bloc I	Lame3	10%
Bloc H	Lame4	<1%

**3.3.3 COMPARAISON DE LA METHODE MANUELLE PAR APPORT À LA METHODE AUTOMATISEE**

L'appareil Autostainer Linker (Dako) a permis d'automatiser l'immunohistochimie (IHC), facilitant ainsi l'évaluation de l'expression membranaire des cellules tumorales infiltrantes pour les anticorps anti-PDL-1. Cette automatisation optimise la qualité des procédures

assurant une évaluation précise et reproductible. Cependant, la comparaison que nous avons effectuée était une analyse comparative entre la méthode manuelle et la méthode automatisée de référence.

Nous avons utilisé un ensemble de 64 lames provenant de 32 échantillons distincts. Chacun de ces échantillons a été divisé en deux lames, permettant ainsi d'obtenir deux groupes distincts: l'un examiné sur Automate, et l'autre soumis à une analyse manuelle. Ces 32 paires de lames ont constitué la base de notre comparaison, avec 32 lames examinées par le biais de l'automatisation et les 32 autres analysées manuellement. Le résultat de cette comparaison est illustré dans le tableau 9.

**Tableau 9. Comparaison de méthodes**

Nb d'échantillons	Technique sur Automate	Technique manuelle
Bloc1	<1%	<1%
Bloc2	<1%	<1%
Bloc3	<1%	<1%
Bloc4	<1%	<1%
Bloc5	<1%	<1%
Bloc6	<1%	<1%
Bloc7	<1%	<1%
Bloc8	<1%	<1%
Bloc9	<1%	<1%
Bloc10	<1%	<1%
Bloc11	1-49%	1-49%
Bloc12	1-49%	1-49%
Bloc13	1-49%	<1%
Bloc14	1-49%	<1%
Bloc15	1-49%	1-49%
Bloc16	1-49%	<1%
Bloc17	1-49%	<1%
Bloc18	1-49%	1-49%
Bloc19	1-49%	1-49%
Bloc20	1-49%	<1%
Bloc21	> 50%	> 50%
Bloc22	> 50%	1-49%
Bloc23	> 50%	> 50%
Bloc24	> 50%	> 50%
Bloc25	> 50%	> 50%
Bloc26	> 50%	> 50%
Bloc27	> 50%	1-49%
Bloc28	> 50%	> 50%
Bloc29	> 50%	> 50%
Bloc30	> 50%	> 50%
Bloc31	> 50%	> 50%
Bloc32	> 50%	> 50%

Les résultats obtenus pour les cas inférieurs à 1% et supérieurs à 50% étaient en parfaite concordance, à l'exception de 4 cas qui se sont avérés inférieurs à 1%, même s'ils étaient initialement situés dans la fourchette de 1% à 49%.

En ce qui concerne les performances de la méthode manuelle, l'analyse a révélé que la sensibilité (Se) de notre méthode est de 82%, ce qui démontre sa capacité à détecter avec précision les cas positifs. En outre, la spécificité (Sp) était de 100%, ce qui signifie qu'elle était exceptionnellement précise pour exclure les cas négatifs.

**La précision diagnostique** globale de notre étude était de 87%, indiquant un niveau élevé de fiabilité dans l'identification des cas. **La valeur prédictive positive (VPP)** était de 100%, ce qui signifie que lorsque notre méthode indiquait un cas positif, il était très probable

que ce soit effectivement le cas. En revanche, la **valeur prédictive négative** (VPN) était de 71,4%, montrant qu'elle pouvait également correctement exclure la plupart des cas négatifs.

En outre, l'**indice de Youden** était de 0,82, ce qui renforce la validité de notre méthode par rapport à l'alternative dans notre échantillon. La **fiabilité**, mesurée à 0,87, était également élevée, soulignant la constance de nos résultats.

Le **coefficient Kappa**, qui s'est élevé à 0,71, ainsi que le **coefficient de corrélation de Matthew** (MCC) à 0,76, ont révélé une performance diagnostique significative de notre méthode:

- Le coefficient MCC (0,76) a une bonne concordance
- L'étendue du coefficient kappa est entre -1 et 1. On parle d'un coefficient kappa bon lorsque l'index kappa  $\geq 0,61$ . Ces résultats démontrent la robustesse de la méthode manuelle et son aptitude à fournir des diagnostics précis.

En conclusion, les tests réalisés manuellement et sur automate ont démontré statistiquement une bonne concordance.

Suite aux résultats des expériences effectuées nous concluons que la technique immunohistochimique du test PDL1 est validé

### 3.3.4 SUIVI DE LA METHODE ET ASSURANCE QUALITE

Le suivi de la méthode est assuré par un contrôle interne de qualité mené de manière simultanée avec tous les tests effectués en utilisant des témoins internes et externes pour interpréter le marquage de l'anticorps anti-PD-L1. La garantie de validité et de la conformité de l'examen, grâce aux résultats des témoins positifs et négatifs, est obligatoire pour la poursuite de l'analyse immunohistochimique.

## 4 DISCUSSION DES RESULTATS DE LA VALIDATION DES METHODES

En discutant les conclusions de notre travail, il ressort que la validation des méthodes est un élément important dans la progression dans la démarche qualité, renforçant l'engagement envers l'amélioration continue de nos pratiques.

Répondant ainsi à l'objectif d'améliorer les pratiques et la progression de la démarche qualité. Le suivi rigoureux des étapes de cette méthode de validation nous a conduit tout d'abord à une analyse des risques et des modalités de maîtrise. Enfin, la démarche expérimentale nous a permis de vérifier et de conclure que les performances de nos méthodes étaient en conformité avec les normes en vigueur. En ce qui concerne les essais de comparaison des méthodes. Les résultats de la méthode manuelle par rapport à la méthode automatisée ont clairement démontré sa capacité à fournir des diagnostics précis.

Pour garantir la validité continue de la technique en immunohistochimie, le laboratoire mis en place également un rigoureux contrôle interne de qualité, mené de manière simultanée avec chaque test. La démarche repose sur l'utilisation de témoins positifs internes et externes, ainsi que de témoins négatifs, dans le but d'évaluer la conformité de toutes les analyses immunohistochimiques réalisées au sein de notre laboratoire. La garantie de validité de chaque examen est impérative pour la poursuite de nos analyses.

## 5 CONCLUSION

La validation des méthodes nous a permis de vérifier et de conclure que les performances de notre méthode étaient en conformité avec les normes en vigueur. En ce qui concerne les essais de comparaison des méthodes, les résultats de la méthode manuelle par rapport à la méthode automatisée ont clairement démontré sa capacité à fournir des diagnostics précis.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à traduire leur gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette étude. Ils remercient également toutes les personnes ayant contribué à l'amélioration de ce travail.

## REFERENCES

- [1] Scherrer F, Boisson RC, Eynard JC, Chamard D, Poggi B, Grafmeyer D. État de l'art et validation de techniques: application aux performances de fidélité. *Ann Biol Clin* 2008; 66 (6).
- [2] Paragraphe 2 du chapitre 5.5 de la norme ISO 15189: 2012.
- [3] Astier-Théfenne H, Wolf A, Darles C, Garnotel E. Vérification d'une méthode selon le SH FORM 44: application à la coloration de Gram. *Rev Fr Lab* 2014; 461: 37-46.
- [4] SH GTA 04-Guide technique d'accréditation de vérification (portée) /validation (portée B) des méthodes en biologie médicale.

- [5] Engel KB, 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: 537—43.
- [6] Bass BP, Engel KB, Greytak SR, et al. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1520—30.
- [7] <http://www.jto.org/article/S1556-0864%2816%2931254-0/> abstract.
- [8] Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJL, et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol* 2014; 67: 923—31.
- [9] Bussolati G, Annaratone L, Maletta F. The pre-analytical phase in surgical pathology. *Recent Results Cancer Res* 2015; 199: 1—13.
- [10] MacGrogan G, Mathieu M-C, Poulet B, et al. [Preanalytical stage for biomarker assessment in breast cancer: 2014 update of the GEFPICS' guidelines in France]. *Ann Pathol* 2014; 34: 366—72.
- [11] *Annales de pathologie* (2014) Recommandations du GEFPICS concernant la phase pré-analytique pour l'évaluation de HER2 et des récepteurs hormonaux dans le cancer du sein.