

« Besoins de l'anatomopathologiste en cas de biopsie d'une tumeur osseuse ou des parties molles – cytogénétique »

A- Biopsie chirurgicale pour le diagnostic des tumeurs osseuses (1)

Le volume, généralement important, **de matériel lésionnel** obtenu, au prix d'une corticotomie plus ou moins étendue, réduit les erreurs d'échantillonnage, les artéfacts d'écrasement cellulaire, visualise les interfaces tissus sain/tissu tumoral et permet tous les conditionnements (fixation, empreintes, congélation, bactériologie, cytogénétique, biologie moléculaire).

Timing : après le bilan d'extension tumoral local et régional (TDM, IRM, scintigraphie) (hémorragie) qui guide le site biopsique ('zone active', zone de nécrose, ...)

Opérateur : chirurgien orthopédiste senior

Biopsie chirurgicale pour le diagnostic des tumeurs osseuses (2)

Gestion des prélèvements biopsiques :

- . prévenir le pathologiste avant la réalisation de la biopsie.
- . volume tissulaire : minimum 1 cm³, réparti sur plusieurs sites si possible, dont un intéressant la corticale, notamment en cas de suspicion de chondrosarcome
- . adresser le plus rapidement possible les prélèvements au pathologiste, accompagnés d'informations cliniques et des données de l'imagerie .

1 - fixation formol

2 - congélation d'un fragment ou conservation en RNA Later: selon contexte et en fonction de la consistance du matériel

3 - prélèvements bactériologiques éventuels selon contexte (à réaliser au bloc de préférence)

3 – réalisation d'écrasis ou empreintes pour FISH

4 – et mise en culture en milieu RPMI pour cytogénétique

B- Biopsie à l'aiguille fine et trocar pour le diagnostic des tumeurs osseuses

But : doit offrir une chance raisonnable d'obtenir suffisamment de matériel pour établir un diagnostic histologique exacte et un grading. Rapide, peu onéreuse, elle réduit les risques de fracture, infection et essaimage tumoral

Timing : après le bilan d'extension tumoral local et régional (TDM, IRM scintigraphie)

Indications : « closed biopsy is not recommended for the diagnosis of most primary bone tumors » J Mirra

Les biopsies à l'aiguille/ drill sont toutefois adaptées pour

- la confirmation d'une maladie métastatique
- d'une infection ou d'un granulome éosinophile
- la confirmation de la nature sarcomateuse d'une tumeur présentant toutes les caractéristiques cliniques et d'imagerie d'un ostéosarcome conventionnel
- la confirmation d'une récurrence locale
- les tumeurs d'accès difficile du pelvis et vertébrales (son échec ne compromettra pas une biopsie chirurgicale ultérieure)





Biopsie chirurgicale pour les tumeurs des tissus mous

Gestion des prélèvements :

- . prévenir le pathologiste avant la réalisation de la biopsie
- . prélever sur plusieurs sites biopsique si possible
- . adresser le plus rapidement possible les prélèvements au pathologiste, accompagnés d'informations cliniques et des données de l'imagerie .

1 - fixation formol

2 - congélation d'un fragment ou conservation en RNA Later

Attention à la déshydratation rapide des petits prélèvements +++ (artéfacts morphologiques irréversibles) : ne jamais les disposer sur une compresse ou un carton (effet buvard)

3 - réalisation d'écrasis ou d'empreintes pour FISH

4 - mise en culture en milieu RPMI pour étude cytogénétique

Les tumeurs des tissus mous font parties du groupe des tumeurs, retenus par l'INCa, comme devant être congelées systématiquement à des fins sanitaires (pour analyses de biologie moléculaire diagnostique) (2005).

Recommandation opposable

Micro biopsies dans le diagnostic des tumeurs des tissus mous

Modalités : aiguilles 14G, (2 à 4 passages en moyenne) (+/- cytoponction 22G).
Le choix du site de ponction est critique.

- la majorité des biopsies doivent être immédiatement fixées en formol, (déshydratation rapide des prélèvements).
- Si le transfert vers le service de pathologie ne peut être réalisé dans les 15-20 min le reste est placé dans un milieu de culture de type RPMI et adressé dans les meilleurs délais au pathologiste pour : congélation, éventuelles appositions.
- examen extemporané si doute quant à la représentativité du matériel

Avantage vs biopsie chirurgicale : faible morbidité (réalisable en ambulatoire, pas d'anesthésie, pas de cicatrice, pas de retard à la radiothérapie et la chimiothérapie)

Inconvénients : liés au caractère peu abondant du matériel

Quel diagnostic peut-on faire :

- authentifier une pathologie non conjonctive (carcinome, mélanome, lésion inflammatoire, ...)
- typer une lésion conjonctive bénigne caractéristique,
- authentifier un sarcome de grade intermédiaire ou haut grade

Il est souvent impossible de préciser le caractère bénin ou malin :

- d'une tumeur d'allure neurofibromateuse
- d'une tumeur adipeuse d'allure 'lipomateuse' (assistance par le FISH MDM2)
- d'une tumeur à cellules fusiforme sans critère franc de malignité
- d'une tumeur myxoïde sans critère franc de malignité

Il n'y a souvent pas de grading possible sur micro biopsie (surface tumorale insuffisante)

Le typage du sarcome est souvent difficile : hétérogénéité tumorale (ex liposarcome dédifférencié) ou entité à critères de définition 'flous'

La micro biopsie n'est raisonnable que dans le cadre d'une prise en charge du patient par une seule équipe multidisciplinaire : médecin oncologue, chirurgien, radiologue et pathologiste

Outils diagnostiques du pathologiste

- **Coloration standart HES**
- **Analyse immunohistochimique**
- **Biologie moléculaire : RT-PCR, FISH**
- **Cytogénétique**

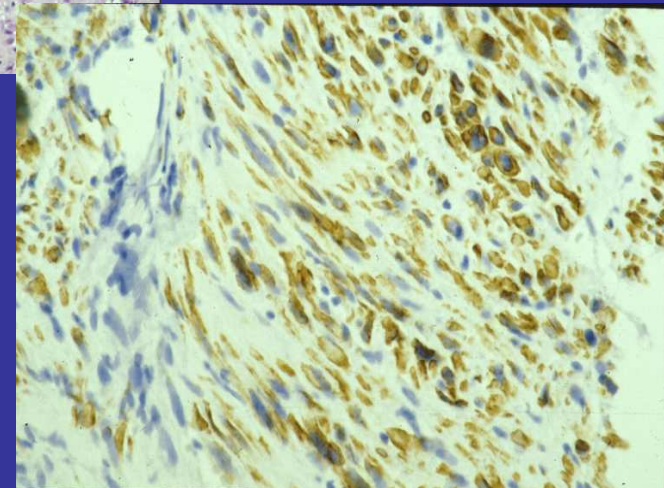
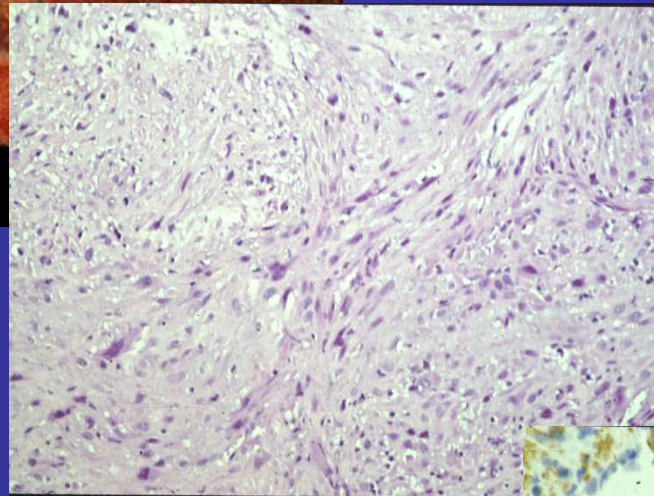
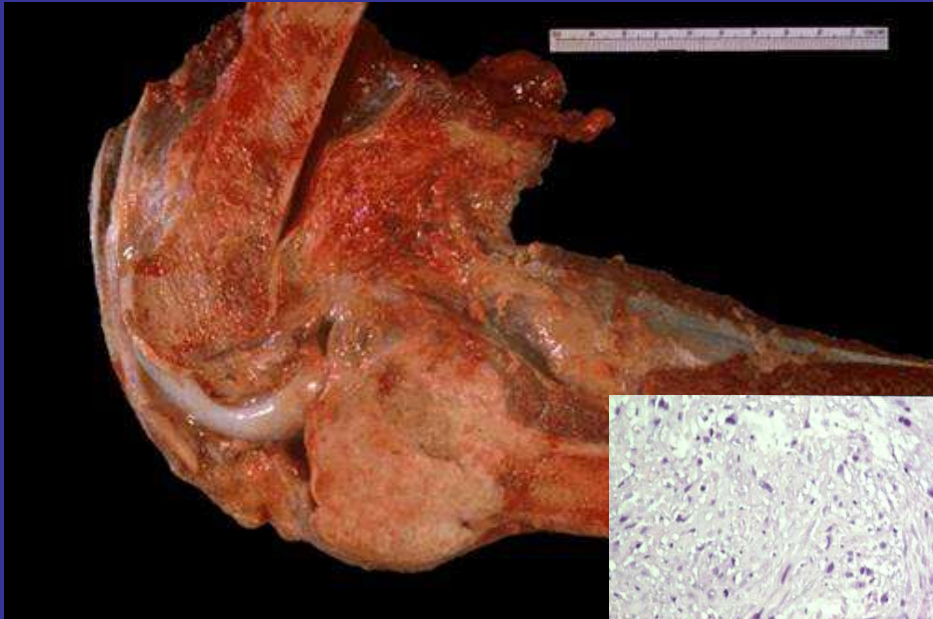
Le diagnostic histologique, qui s'appuie sur tout ou partie de ces techniques, s'effectue selon la classification OMS en cours, complété d'un grading (FNCLCC et autres) à chaque fois qu'il est pertinent.

Les outils de base :

. HES

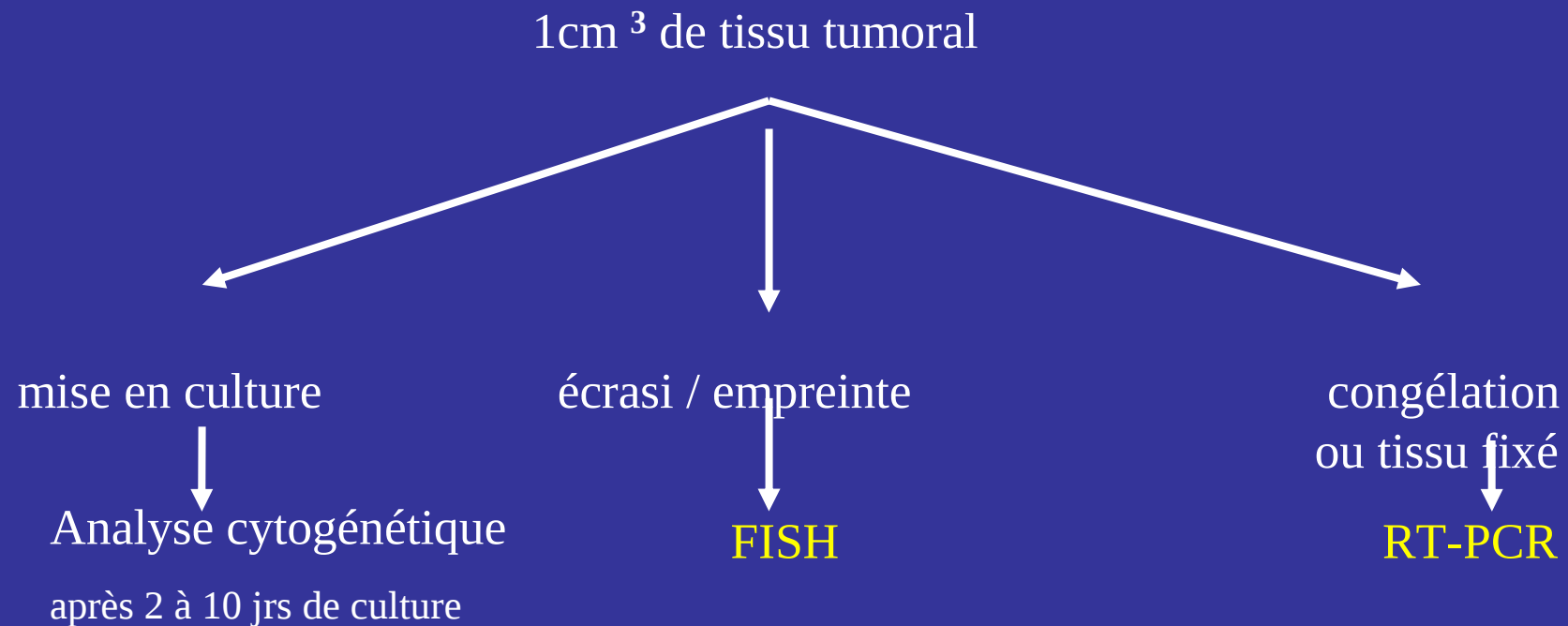
.Imagerie

.Immunohistochimie



L'outil de confirmation
diagnostique : la biologie
moléculaire

- La fixation en formol permet la réalisation croissant d'examens d'oncologie moléculaire diagnostique
- Gestion des prélèvements biopsiques congelés pour les analyses génétiques / biologie moléculaire



Characteristic and Variant Chromosomal Translocations and Associated Fusion Genes in Bone and Soft Tissue Sarcoma

Neoplasm	Translocation	Fusion gene(s)
Alveolar soft part sarcoma	der(17)t(X;17)(p11.2;q25.3)	<i>ASPL/TFE3</i>
Alveolar rhabdomyosarcoma	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14) t(X;2)(q13;q35) t(2;2)(q35;p23)	<i>PAX3/FKHR</i> <i>PAX7/FKHR</i> <i>PAX3/AFX</i> <i>PAX3/NCOA1</i>
Clear cell sarcoma	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS/ATF1</i>
Congenital fibrosarcoma	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6/NTRK3</i>
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1/PDGFB</i>

Desmoplastic small round cell tumor	t(11;22)(p13;q12)	EWS/WT1
Epithelioid hemangioendothelioma	t(1;3)(p36;q25)	?
Ewing sarcoma/pPNET	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(q22;q12) t(17;22)(q21;q12) t(2;22)(q33;q12) inv(22)(q12q12) t(16,21)(p11;q22)	EWS/FLI1 EWS/ERG EWS/ETV1 EWS/EIAF EWS/FEV EWS/ZSG FUS/ERG
Extraskeletal myxoid chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11) t(9;15)(q22;q21) t(3;9)(q11-12;q22)	EWS/NR4A3 RBP56/NR4A3 TCF12/NR4A3 TFG/NR4A3

Low Grade Fibromyxoid Sarcoma and Hyalinizing Spindle Cell Tumor with Giant Rosettes	t(7;16)(q33;p11)	<i>FUS/BBF2H7</i>
Myxoid/round cell liposarcoma	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	<i>TLS/CHOP</i> <i>EWS/CHOP</i>
Synovial sarcoma	t(X;18)(p11.2;q11.2) t(X;20)(p11.2;q13.3)	SYT/SSX1 SYT/SSX2 SYT/SSX4 SS18L1/SSX1

Anomalies moléculaires observées dans les sarcomes (1)

- **Translocations chromosomiques récurrentes** (10-15% des sarcomes) ; les plus fréquentes concernent : DFSP, liposarcome myxoïde, Ewing et synovialosarcome
 - . la translocation engendre un gène de fusion associant un promoteur (qui confère l'expression) et un domaine de liaison à l'ADN (qui détermine la spécificité de l'expression).
 - . plus rarement il en résulte un facteur de croissance autocrine, comme dans le DFSP et le fibrosarcome à cellules géantes avec le gène de fusion *COL1A-PDGFB*.
 - . autre mécanisme : une fusion entre le domaine catalytique d'un récepteur tyrosine kinase et le gène d'une protéine exprimée, résultant en une tyrosine kinase chimérique activée indépendamment du ligand

Anomalies moléculaires observées dans les sarcomes (2)

- **Mutations spécifiques activatrice ou inhibitrices.**

. la mutation de *KIT* (exon 11 et 9) et de *PDGFRA* (exon 18) associée aux GIST, a pour conséquence une activation constitutive du Kit ou du PDGFRA récepteur tyrosine kinase et une activation en cascade des voies de transcriptions d'aval.

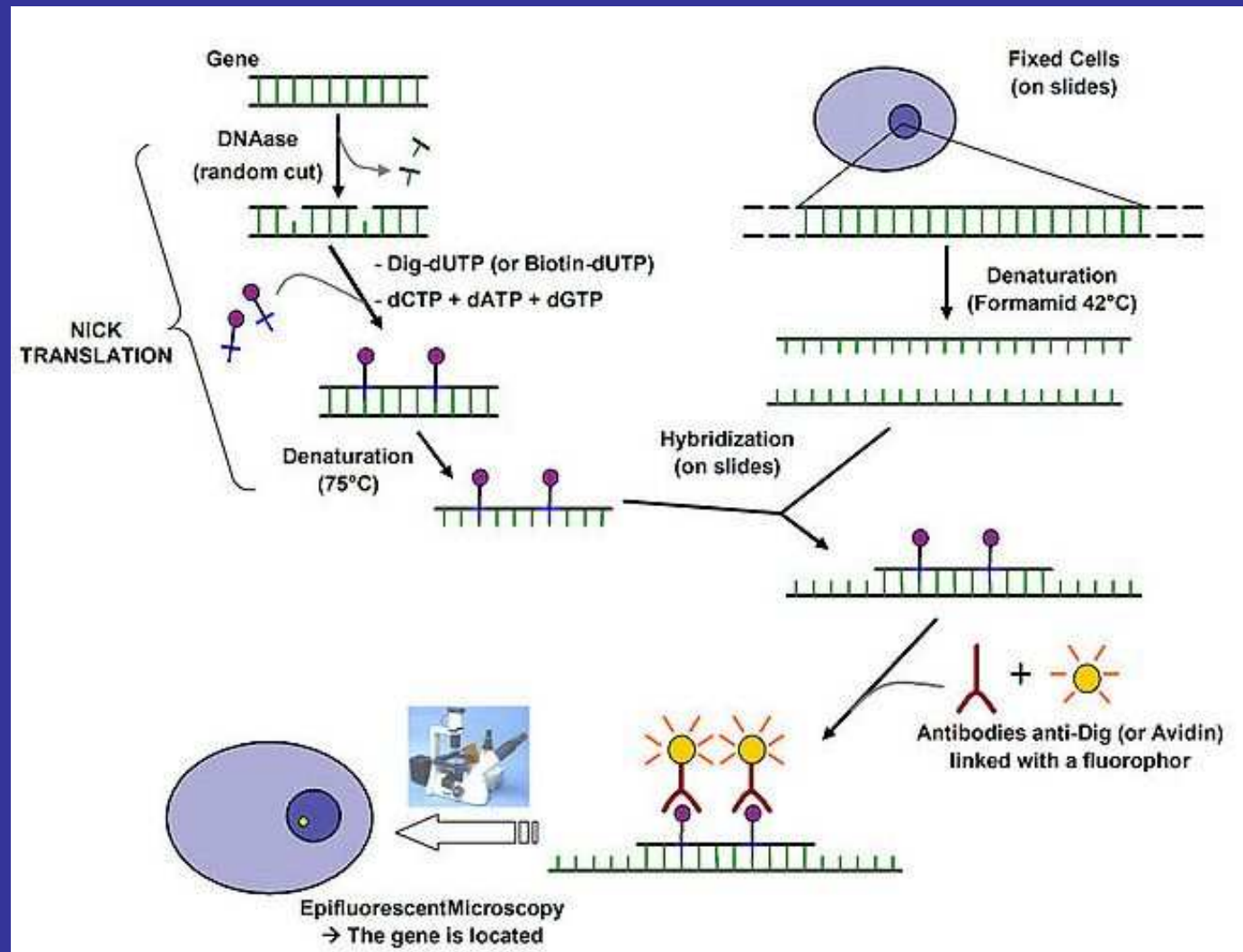
. une inactivation bi-allélique du gène *SMARCB1* est associée aux tumeurs rhabdoides malignes

-**Profil génomique simple avec amplicon 12q14-15** : liposarcome bien différencié et liposarcome dédifférencié : amplification de *MDM2* et *svt CDK4*.

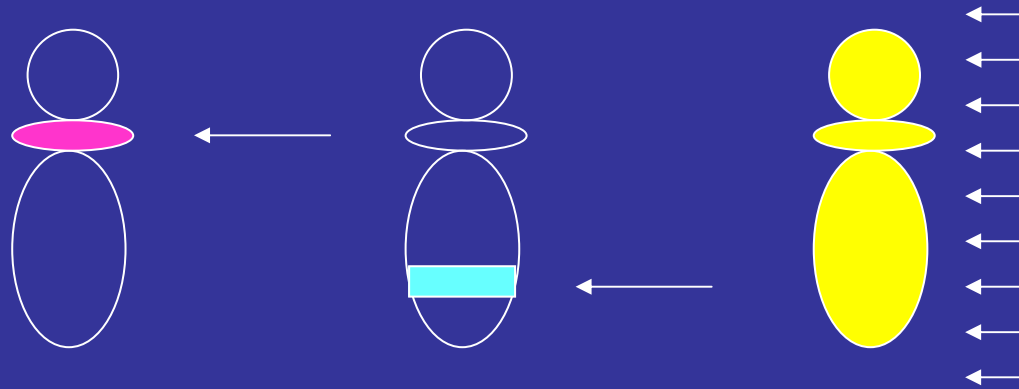
-**Profils génomiques complexes** : leiomyosarcome, myxofibrosarcome, sarcome faiblement différencié (MFH).

Sondes :

- nature : ADN génomique, BAC, oligonucléotide, ribosonde
- marquage : froid (digoxigénine, biotine, fluorochrome, ; radioactif (S 35)



FISH



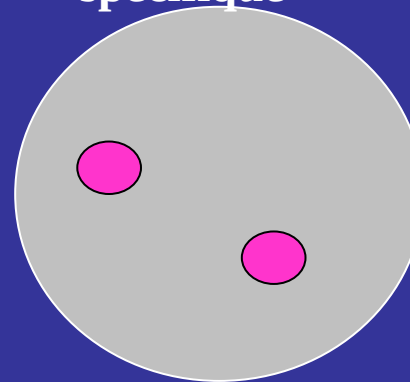
-  sonde centromérique
-  sonde locus spécifique
-  painting par mélange de sondes



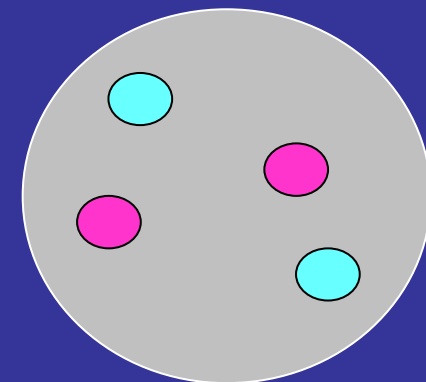
Amplifications
et translocations

Aspect sur cellules en interphase

sonde centromérique
spécifique

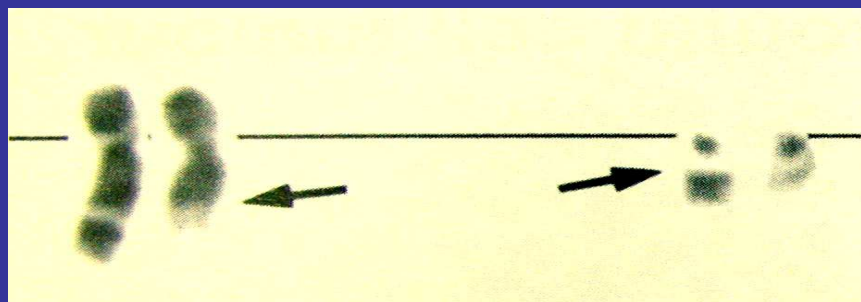
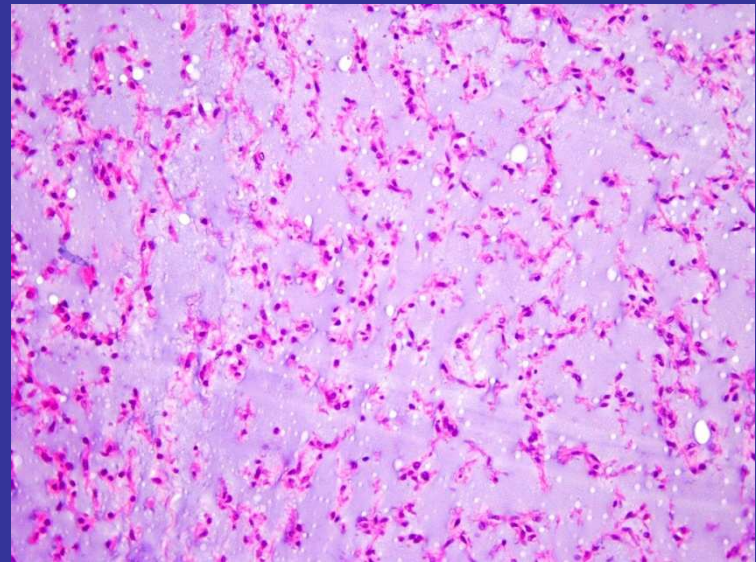


sondes centromérique
et locus spécifiques



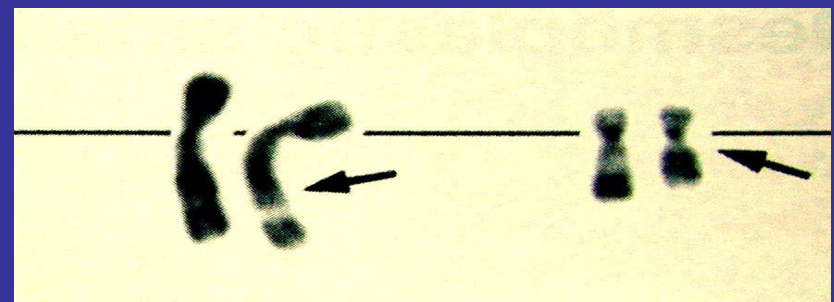
Chondrosarcome myxoïde extra squelettique

Cytogénétique : t(9;22) et t(9;17)



9

22

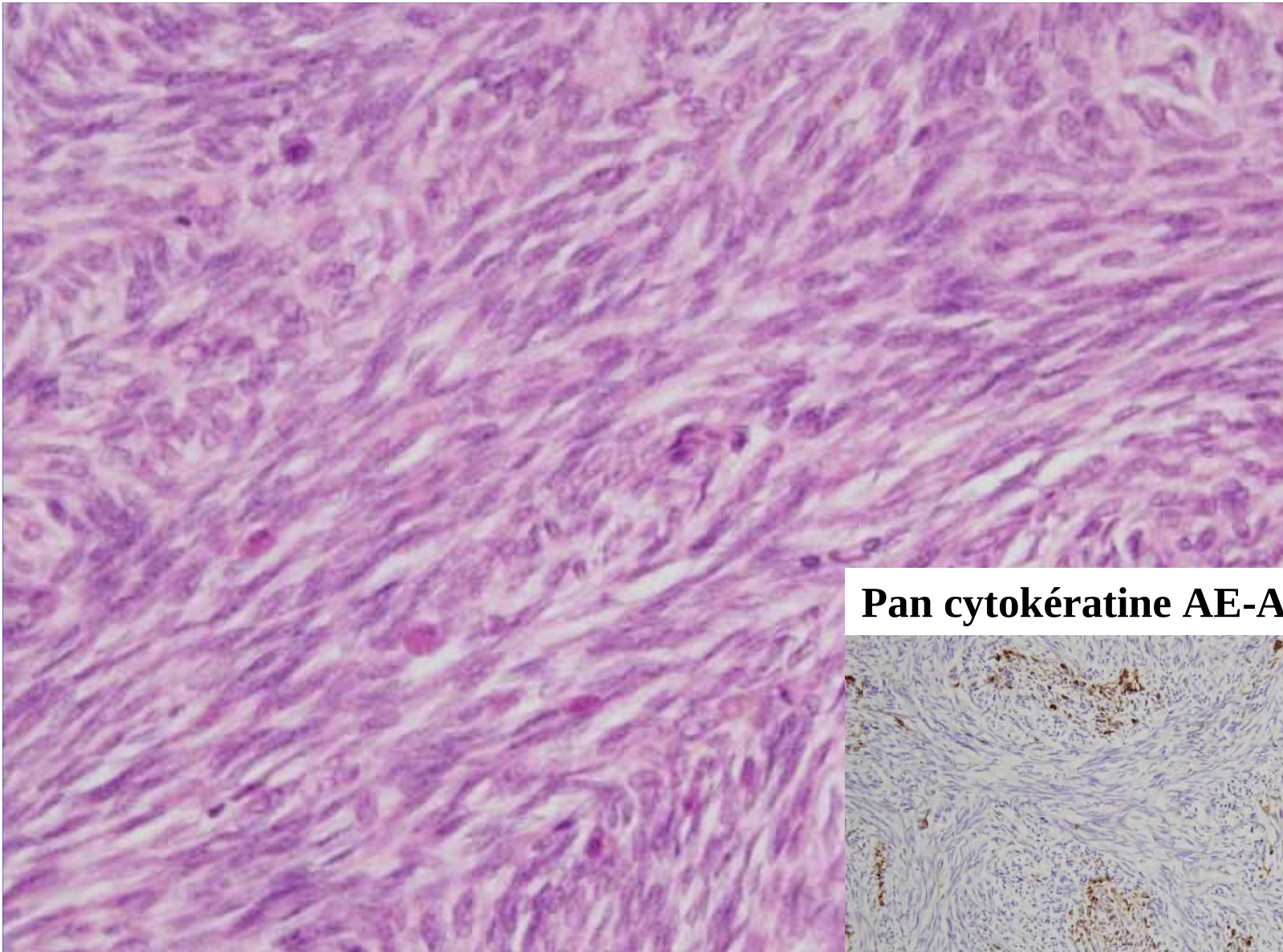


9

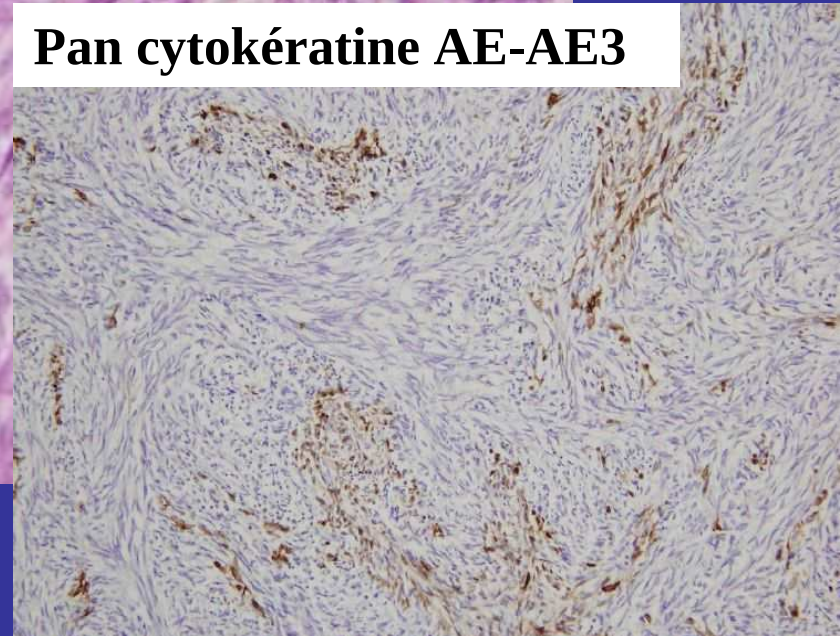
17

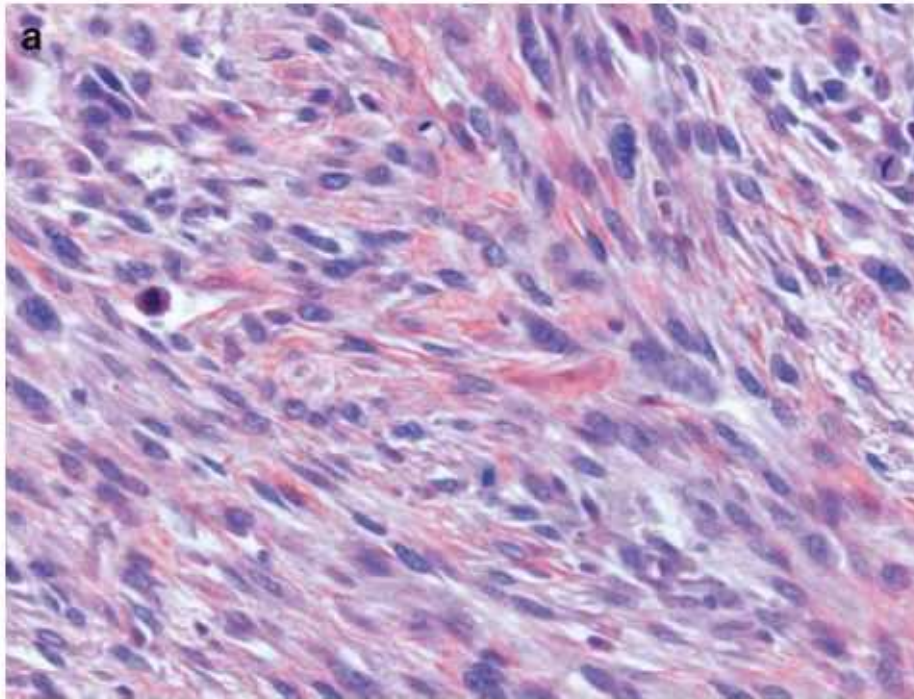
Cas 3

Homme de 68 ans avec une tumeur pleuro-pulmonaire de 10 cm

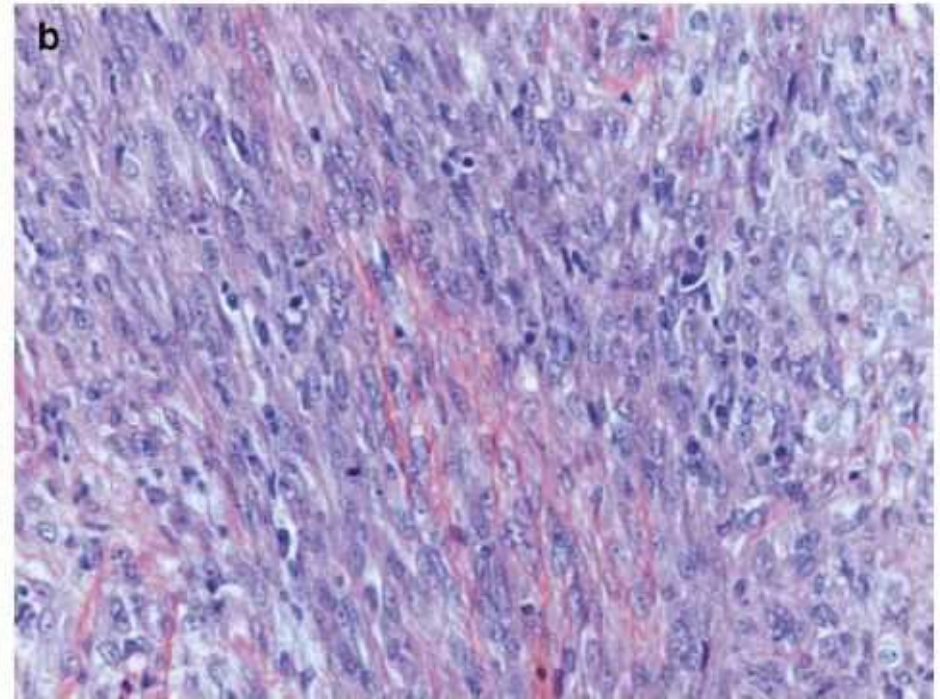


Pan cytokératine AE-AE3

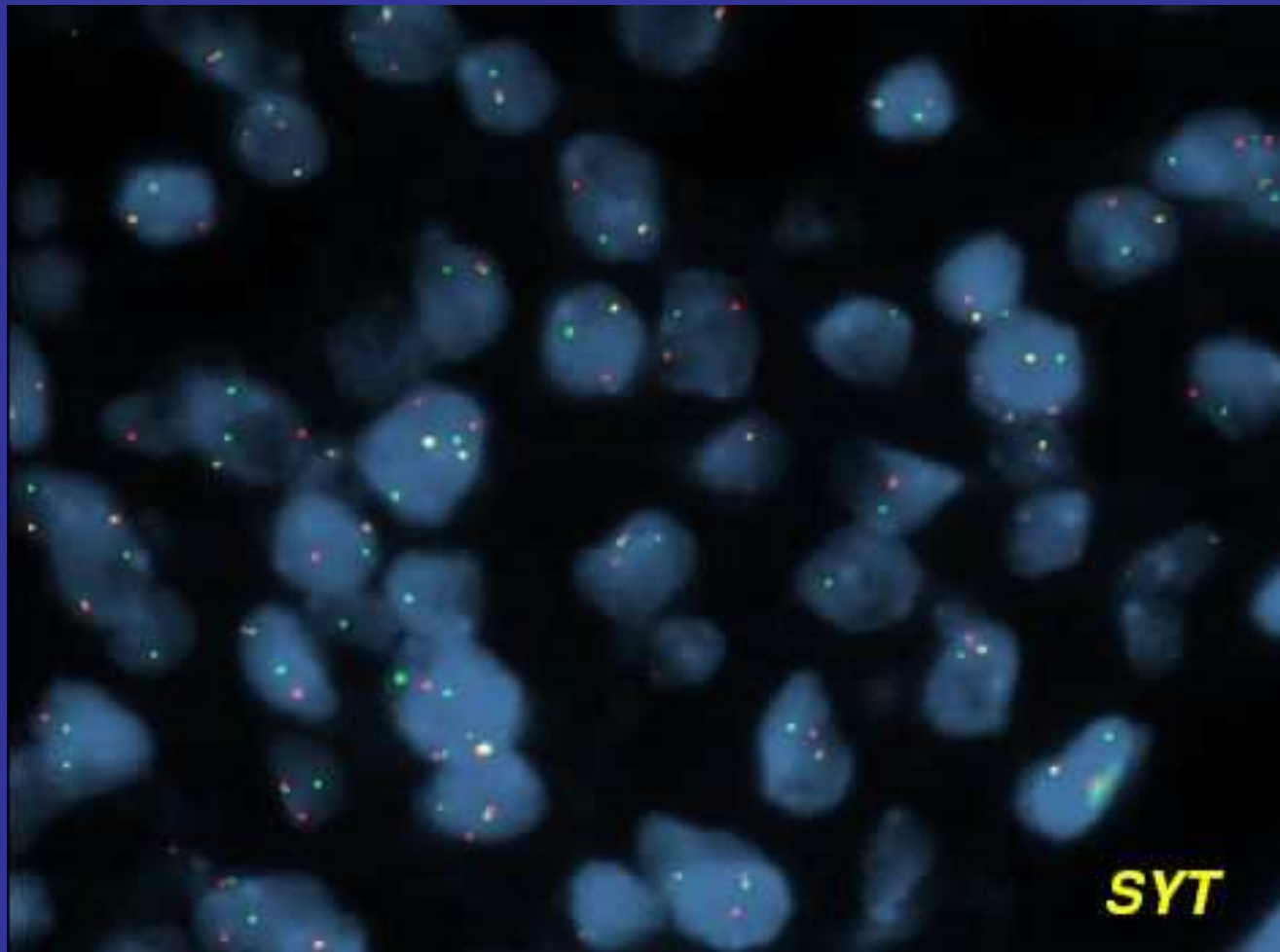


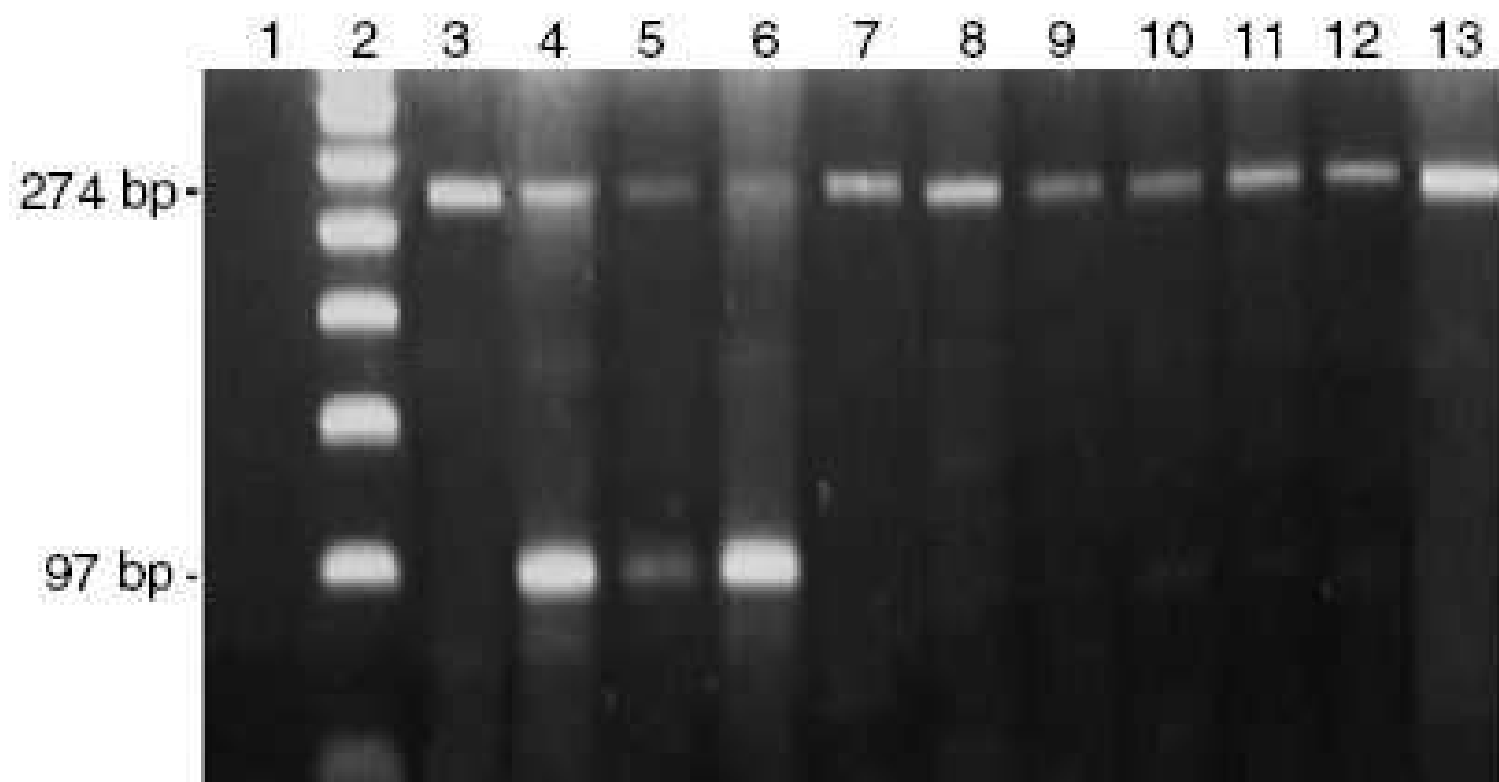


Mésothéliome



Synovialosarcome

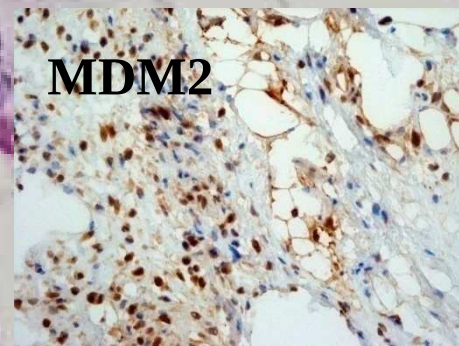
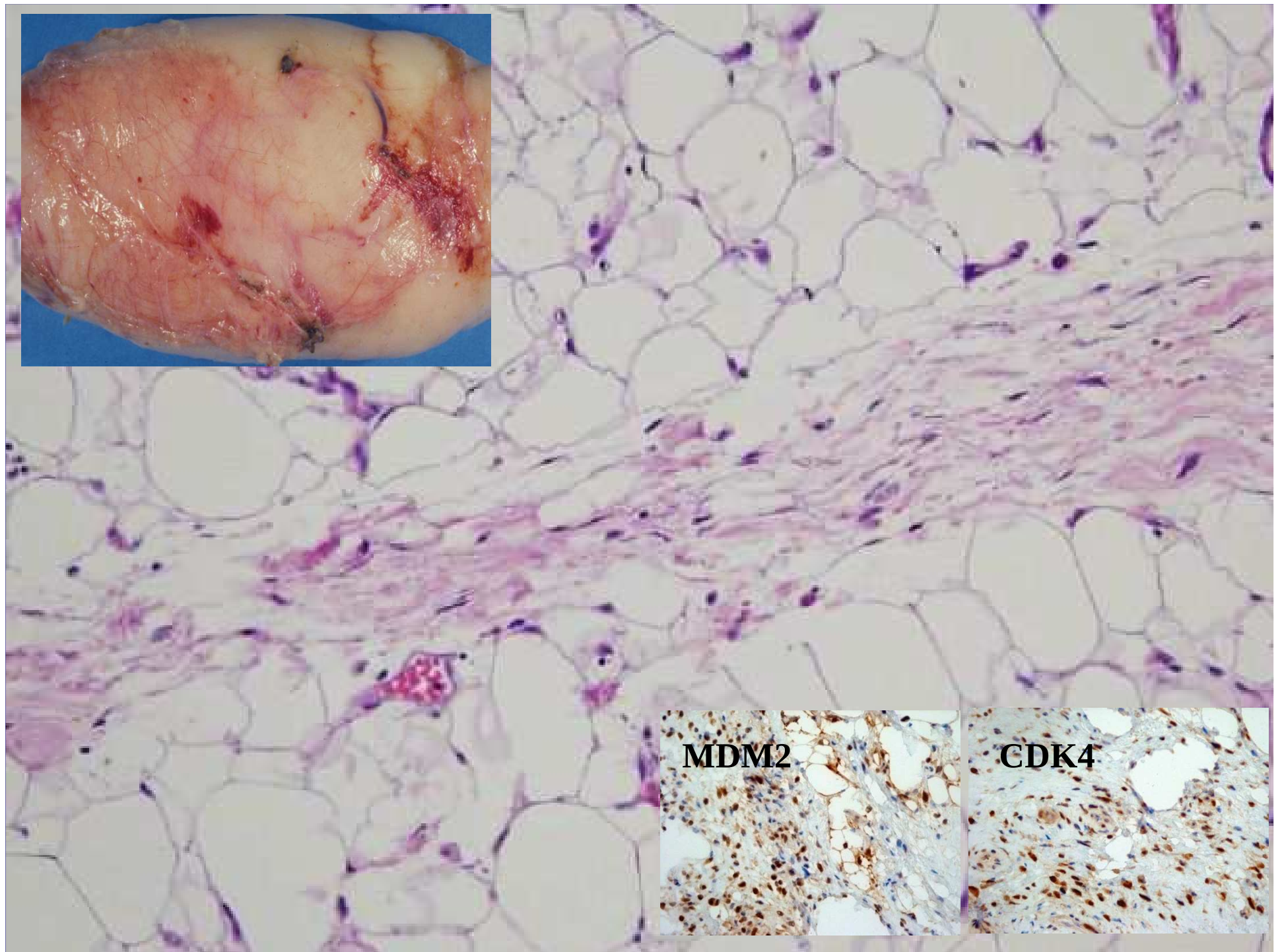




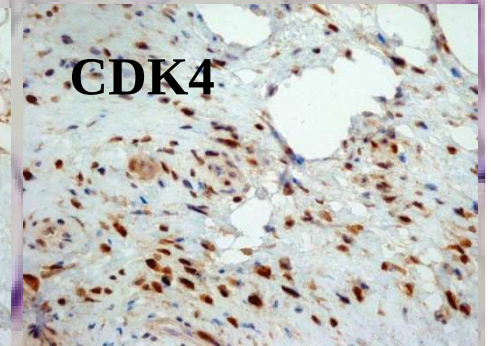
Cas 2

**Homme de 51 ans avec une tumeur rétropéritonéale
L'IRM suggère une tumeur de nature adipeuse**

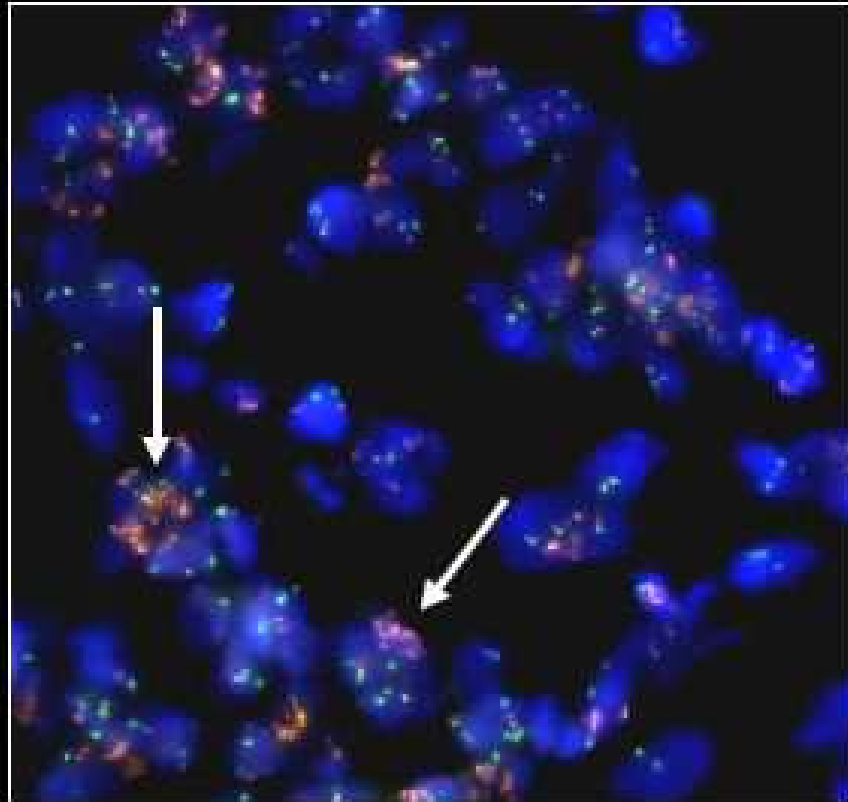




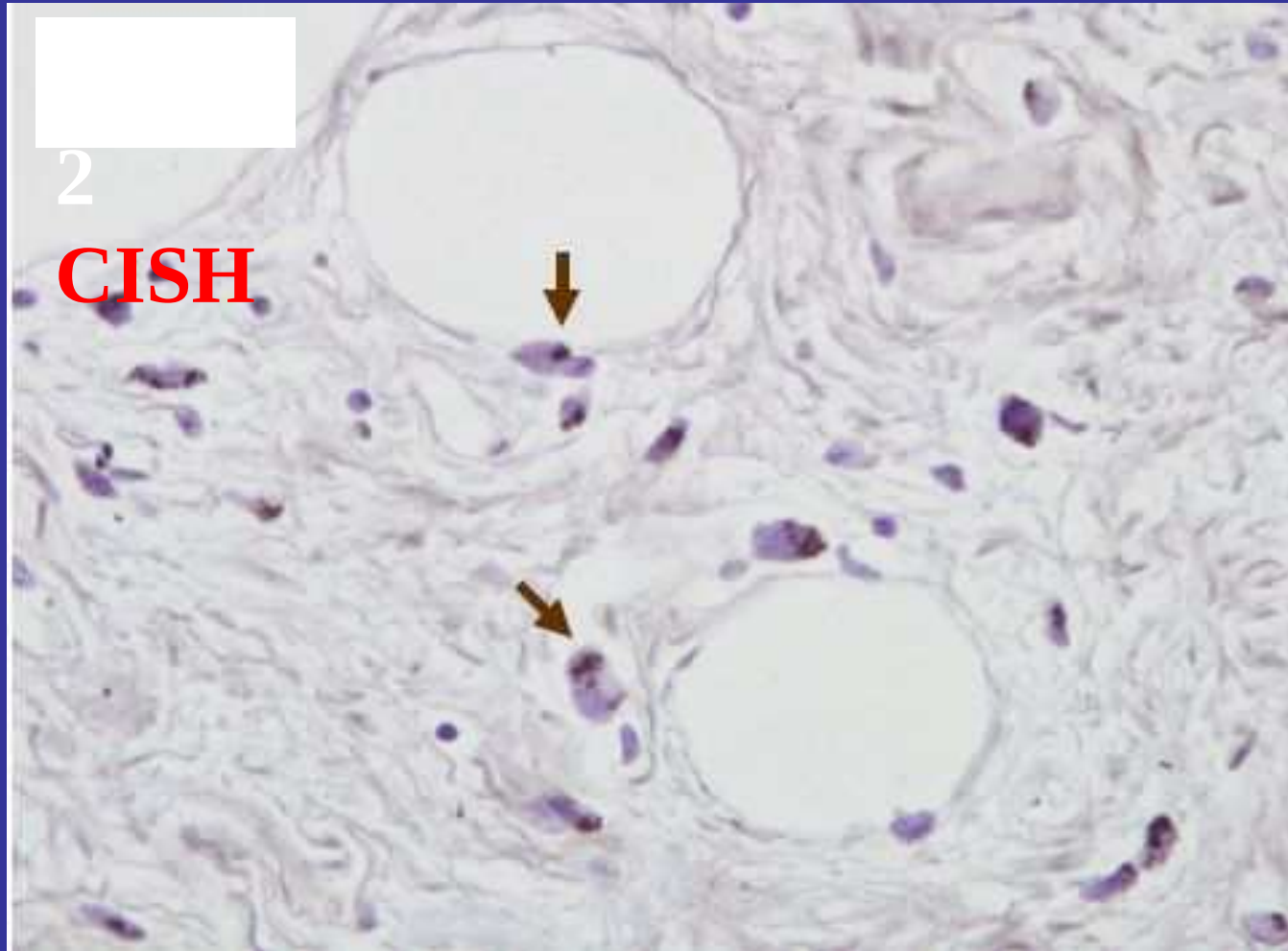
MDM2

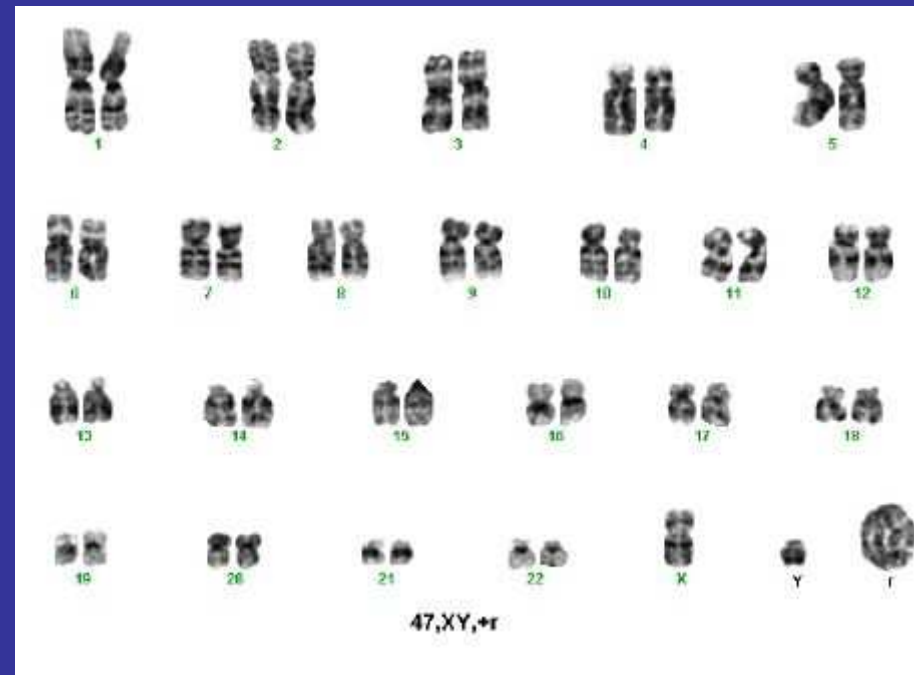


CDK4



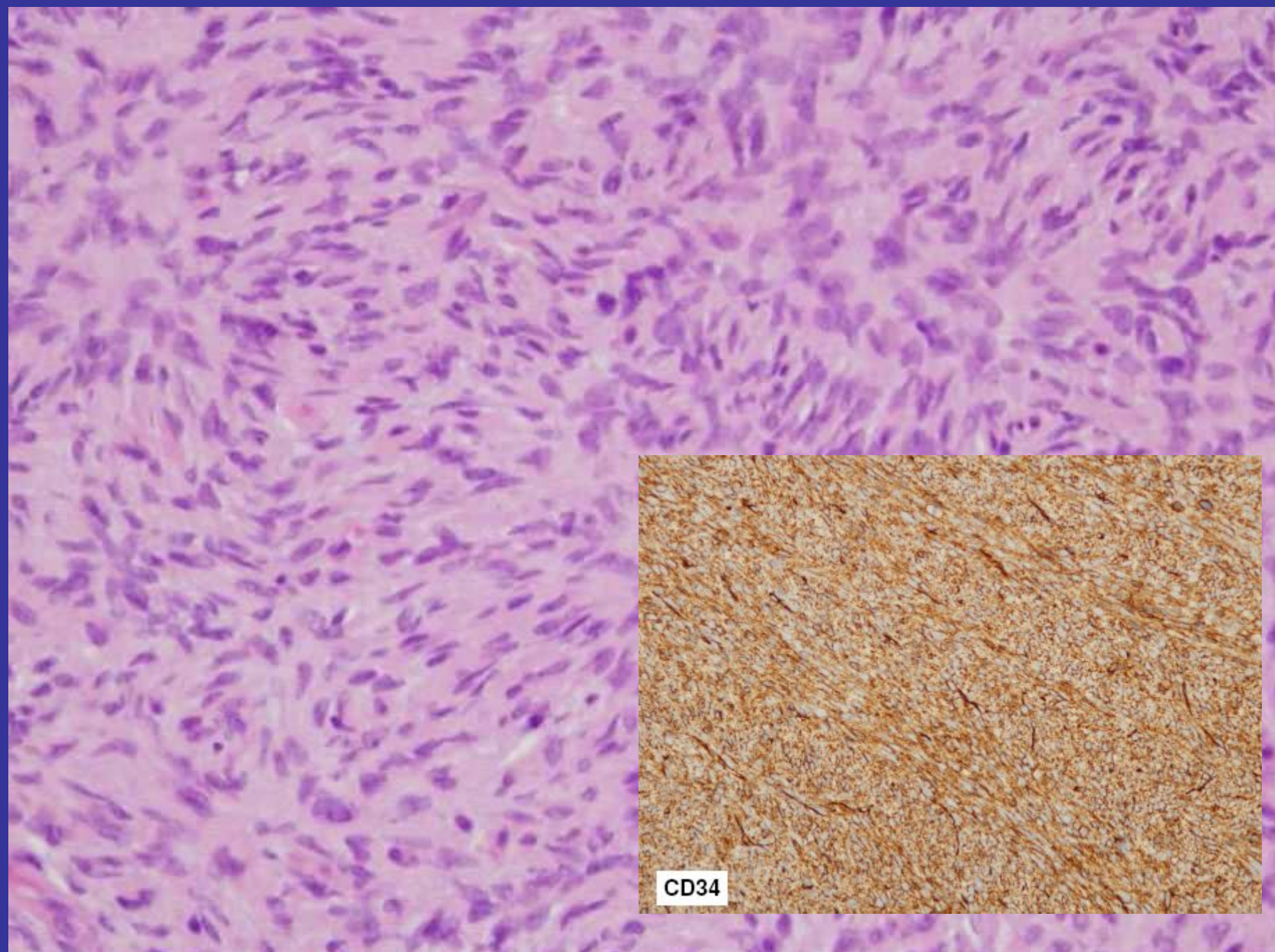
MDM2
CEP 12

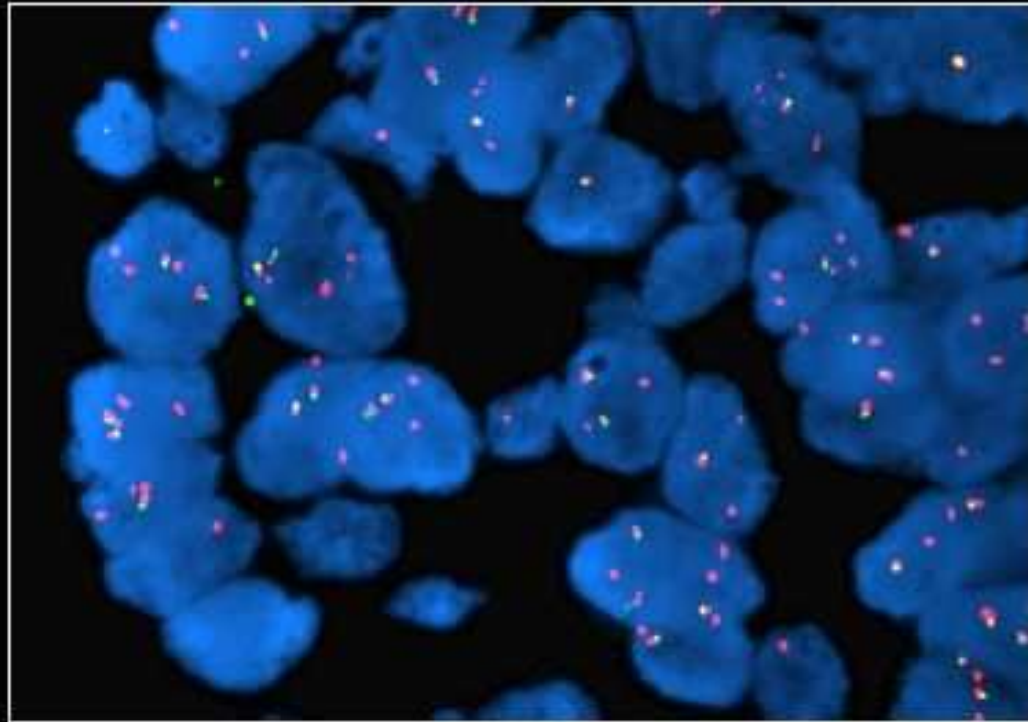




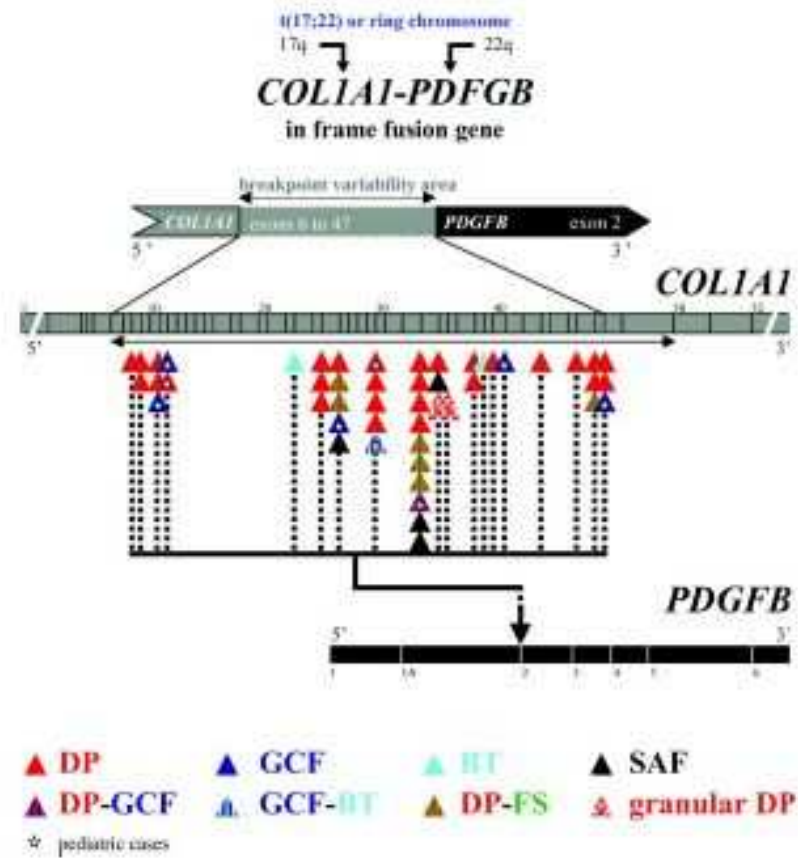
Cas 5

**Femme de 50 ans avec tumeur humérale épiphysaire
distale**





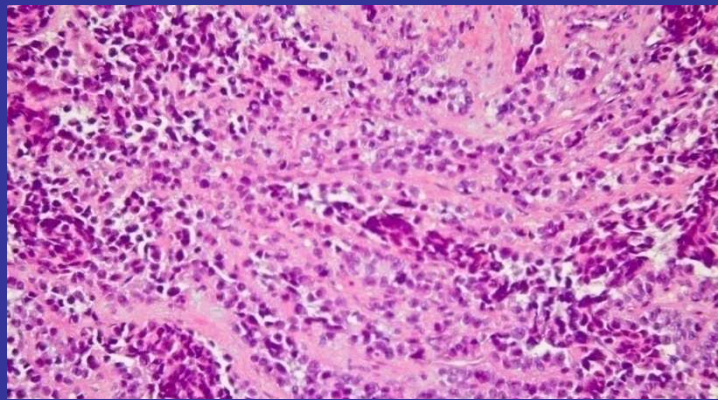
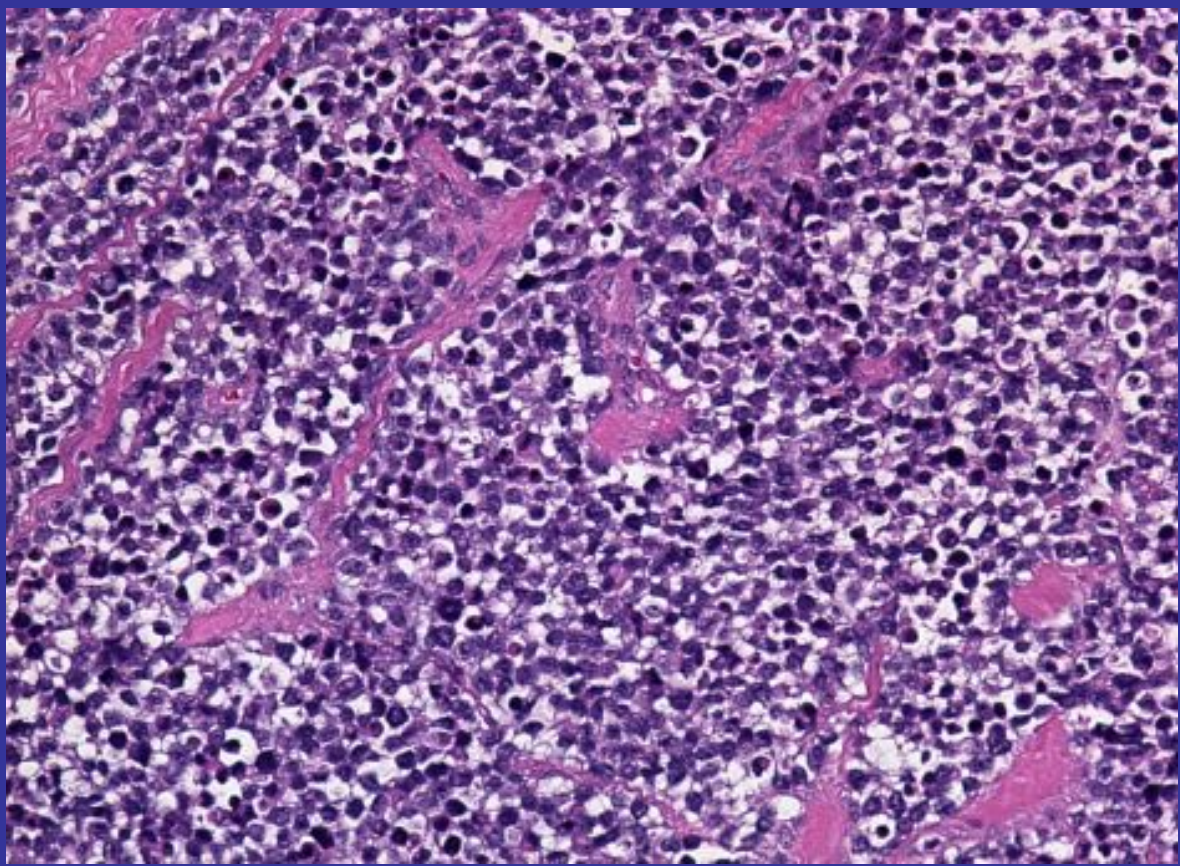
PDGFB 3'
PDGFB 5'



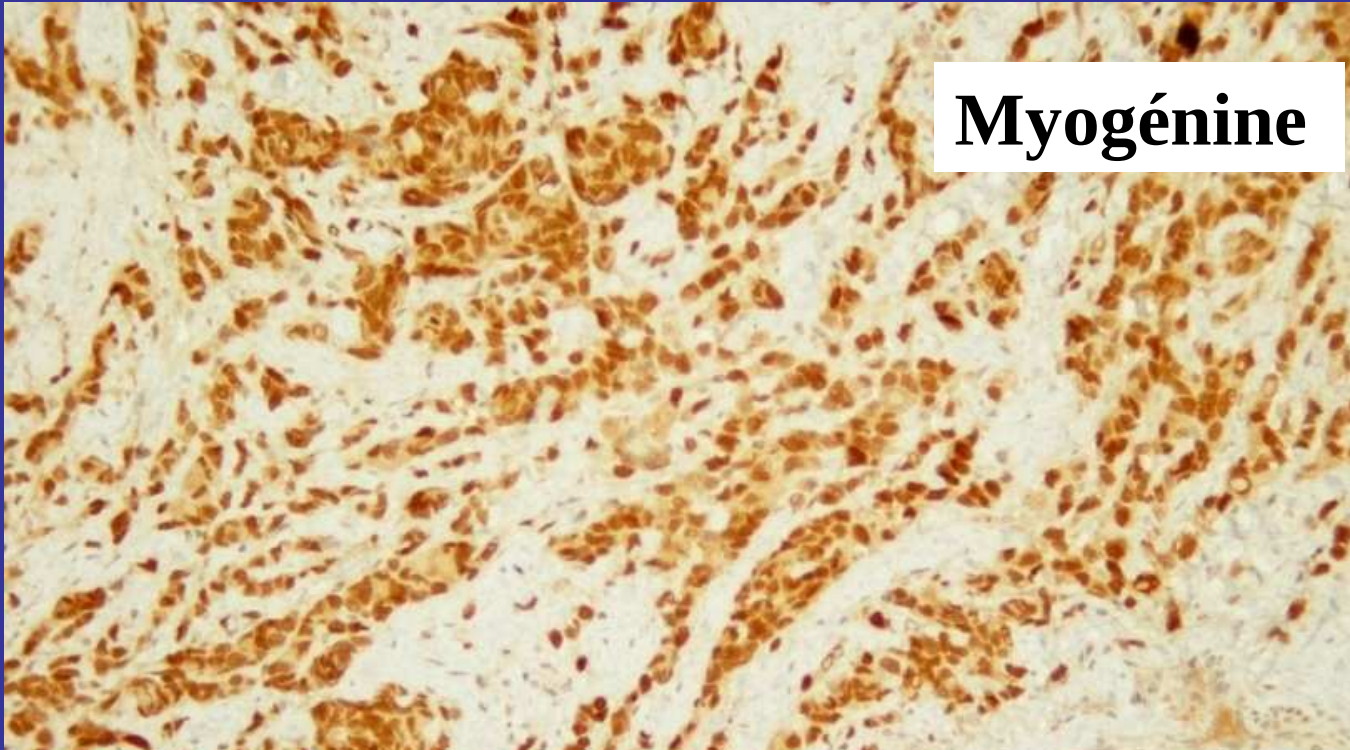
**Dermatofibrosarcome de Darrier Ferrand
métastatique
(COL1A1-PDGF-B)**

Cas 8

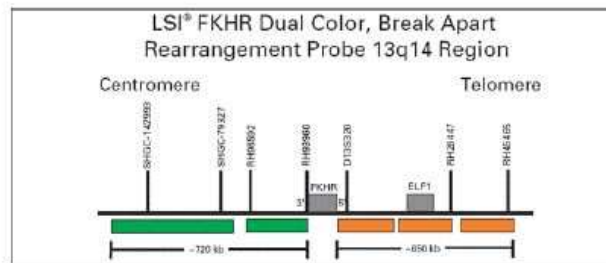
**Garçon âgé de 7 ans avec tumeur à cellules
rondes de la cuisse**



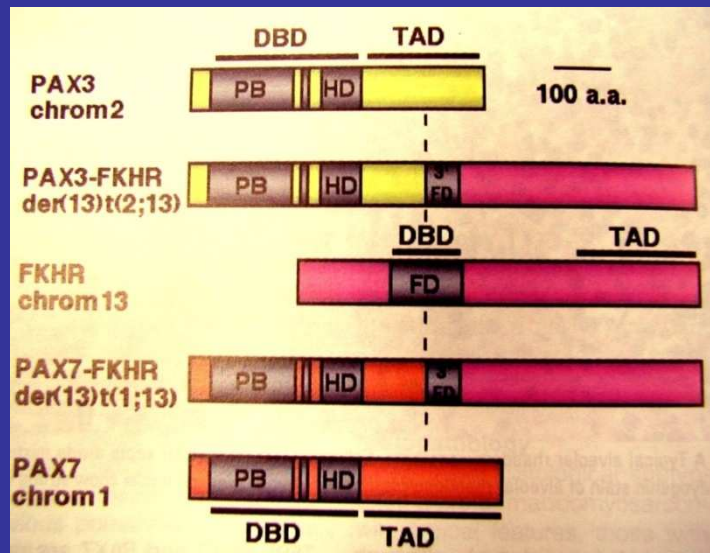
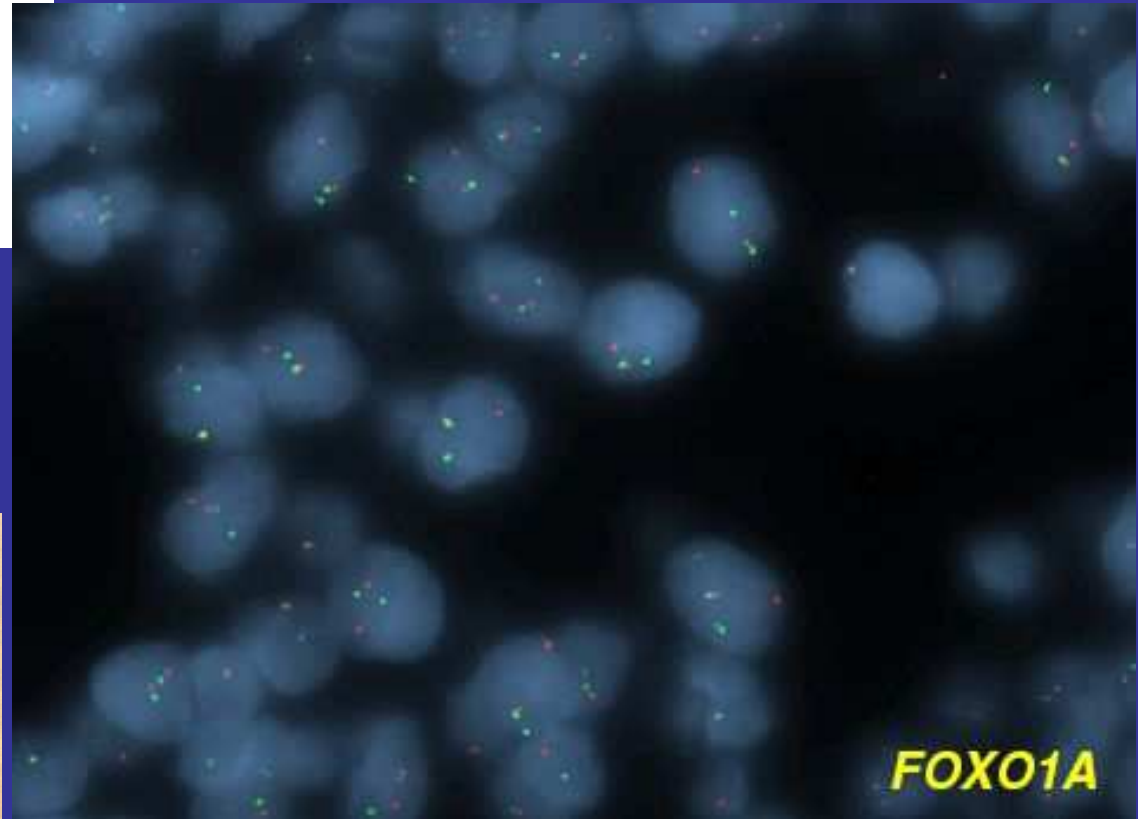
Myogénine



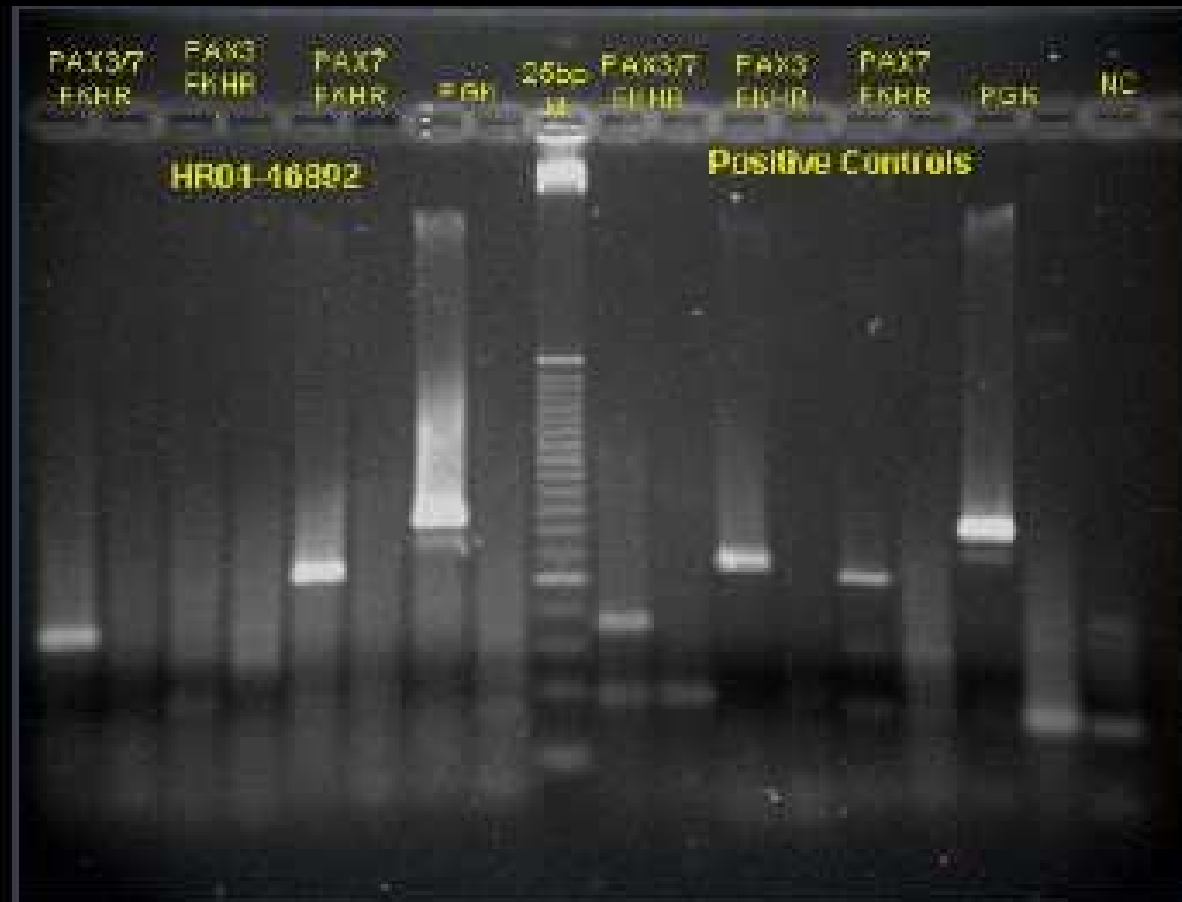
FKHR (FOXO1A)



Rhabdomyosarcome Alvéolaire



Rhabdomyosarcome Alvéolaire (PAX7-FOXO1A)



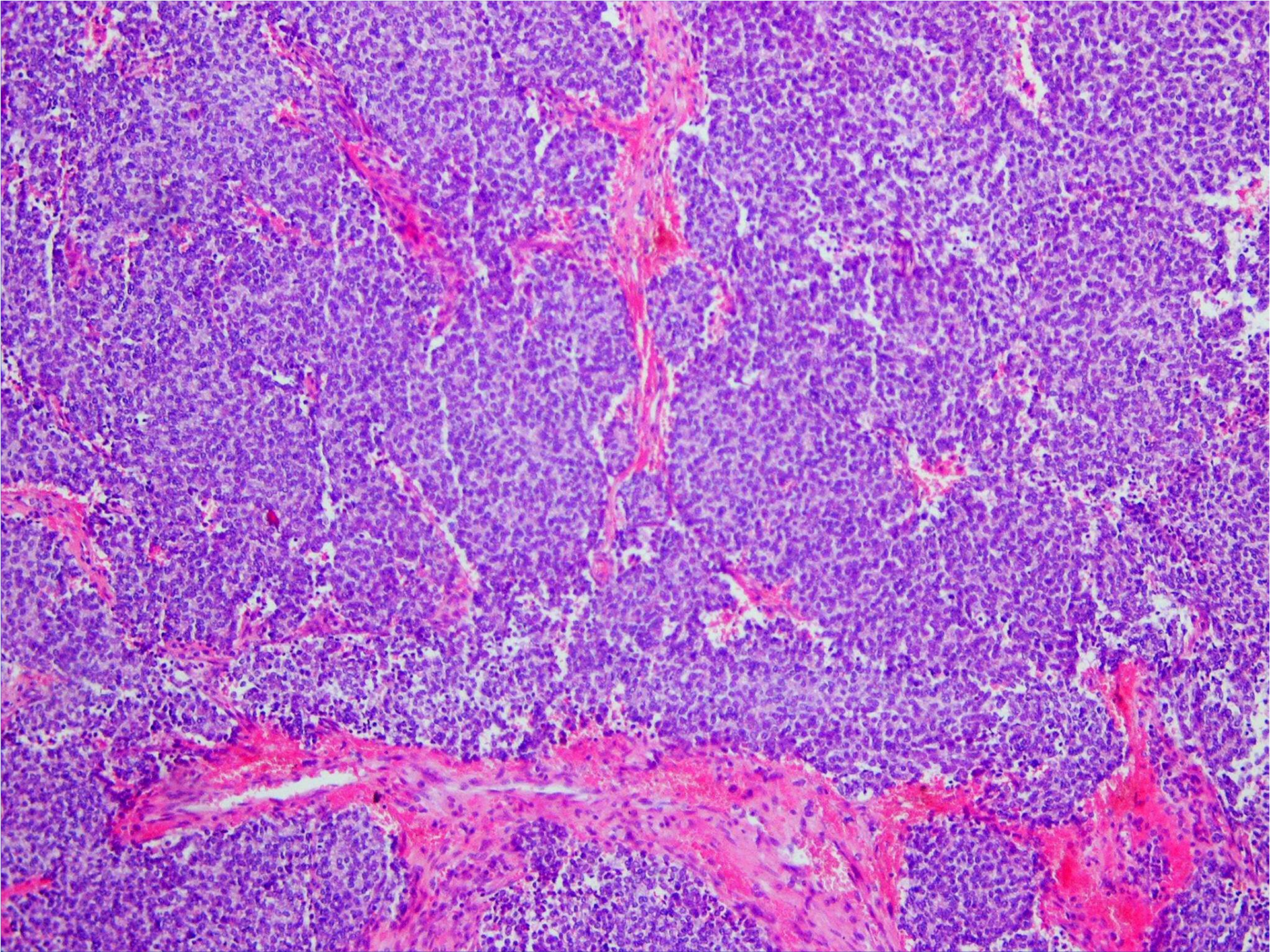
Cas 11

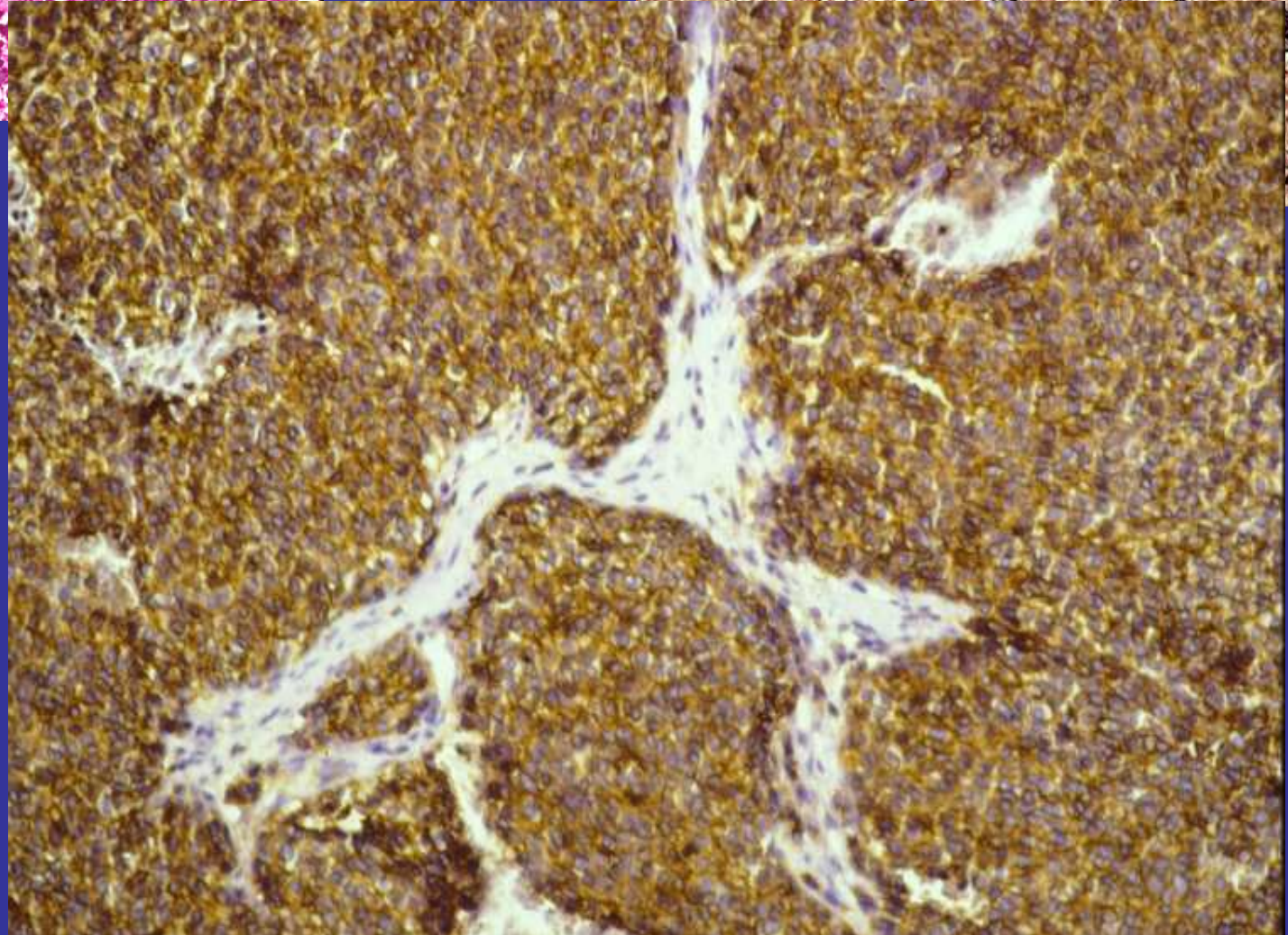
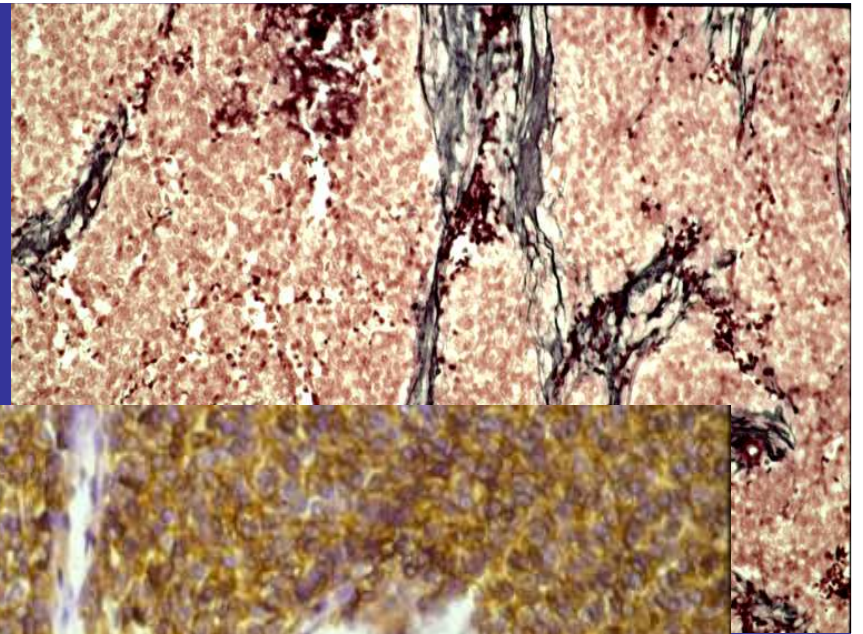
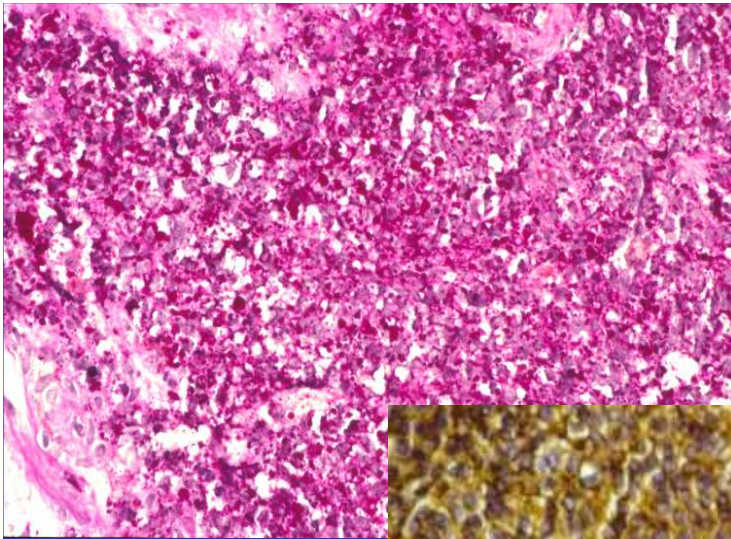
Mégane 5 ans

Chute sur bras G. Mauvaise Rx ; diagnostic de fracture ; immobilisation ; les douleurs persistent,

Déplâtre, Rx : ostéolyse 1/3 sup humérus,

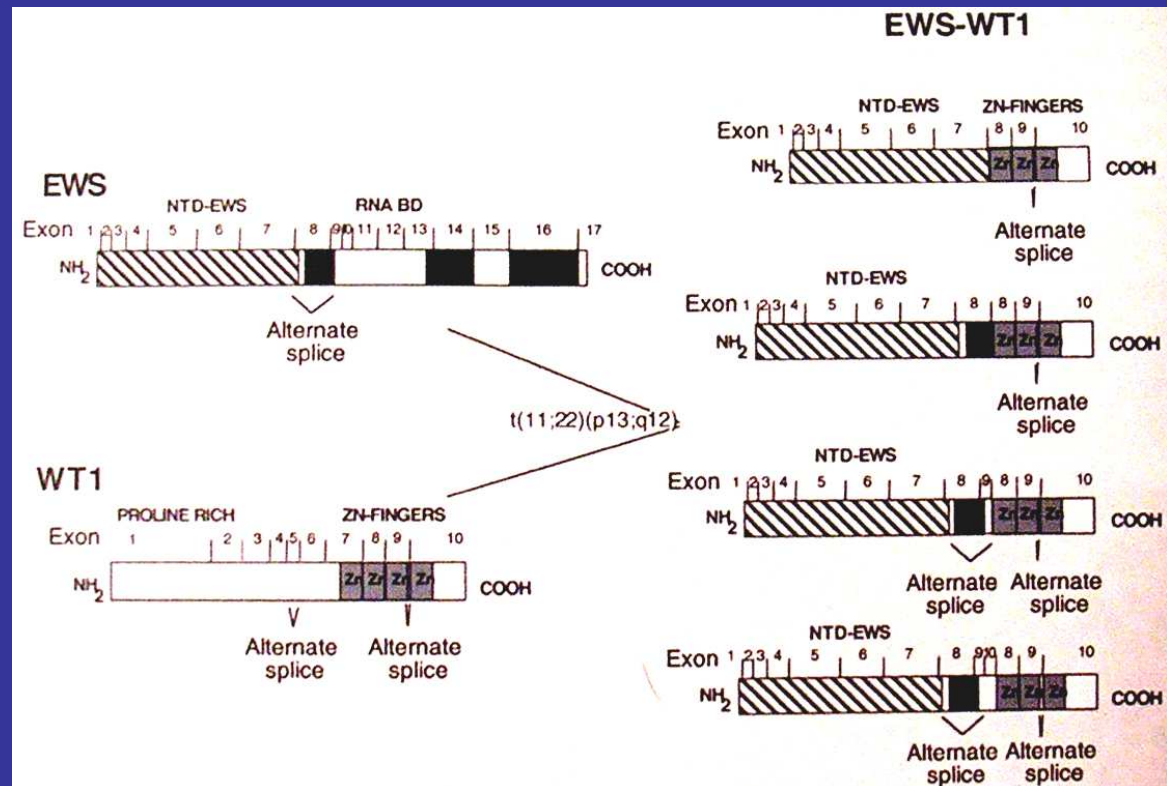
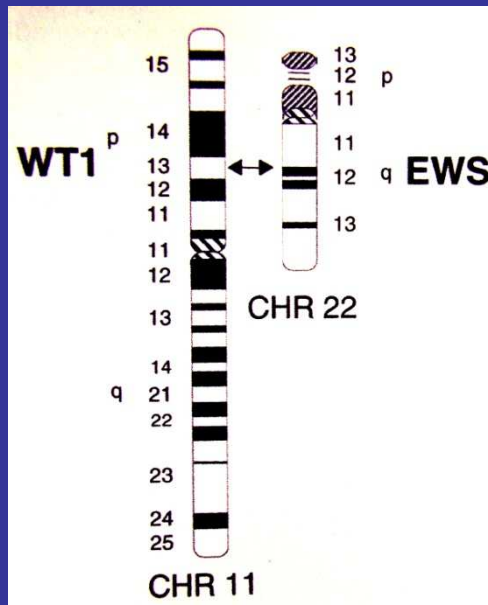
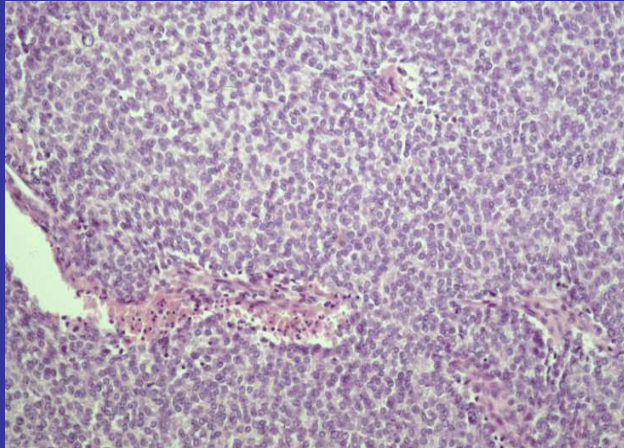


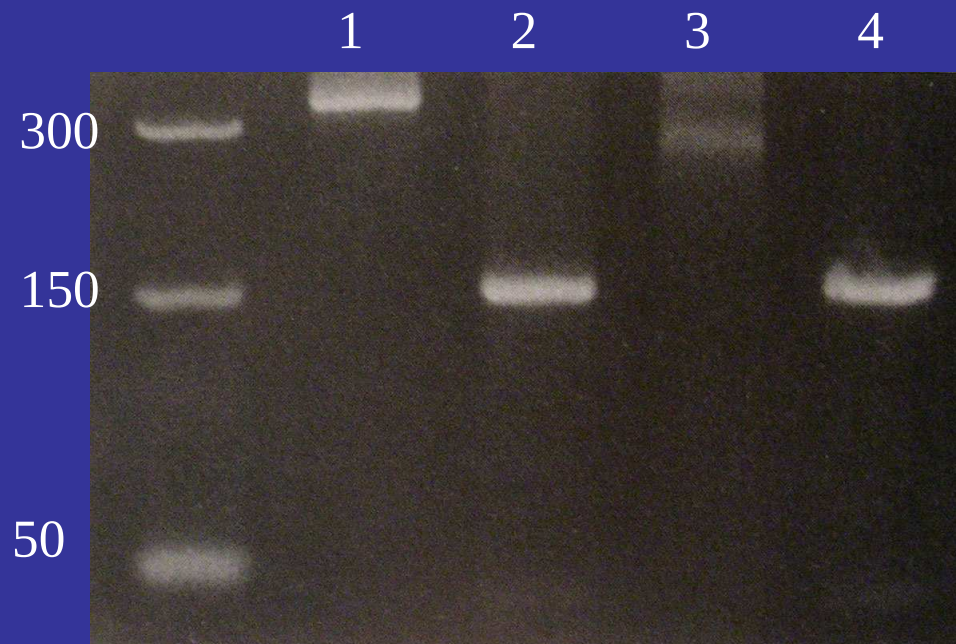




CD99

Sarcome d'Ewing : t(11; 22)



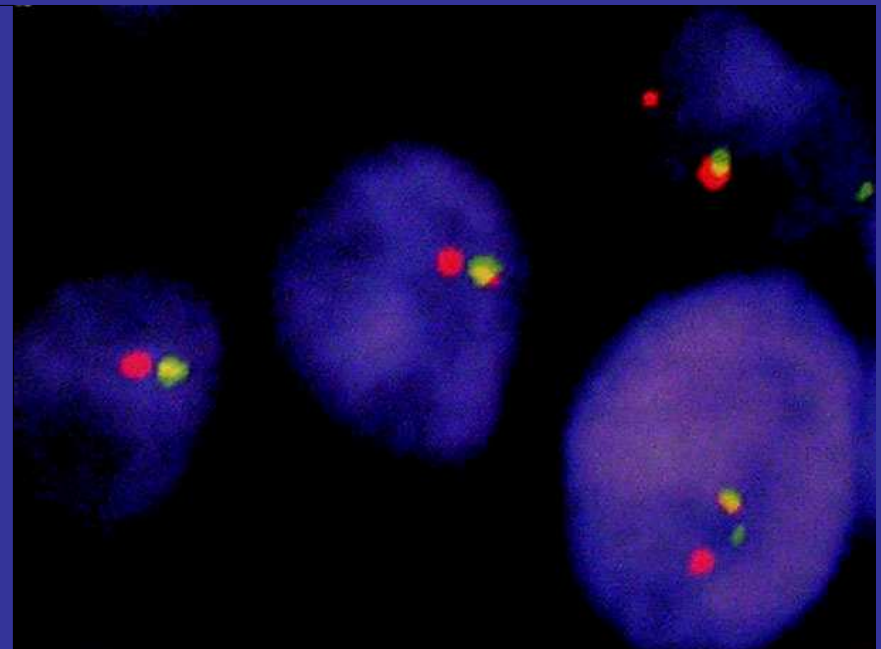
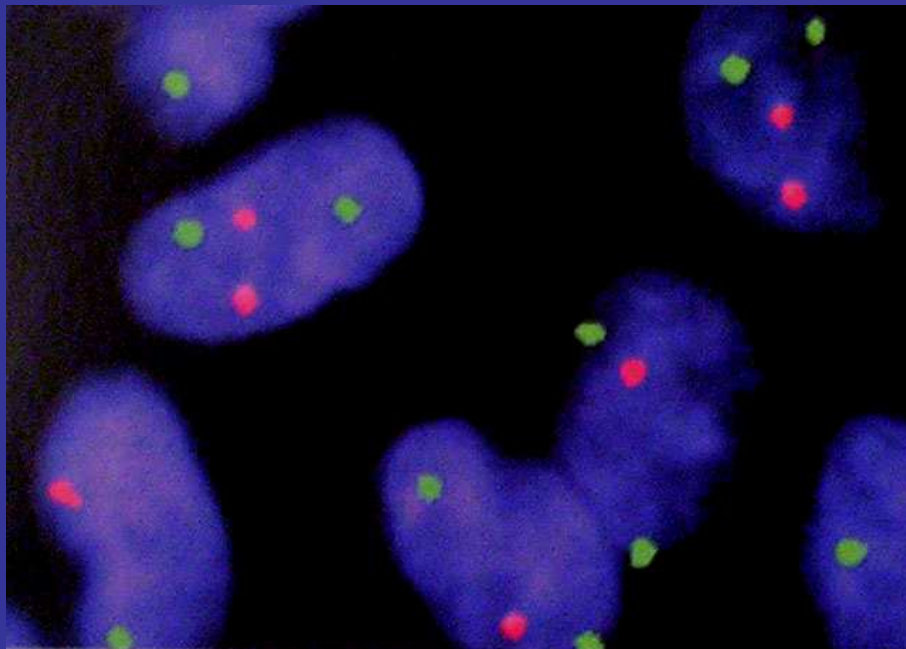


Sarcome d'Ewing : t(11; 22)

Ligne 1 : EWS exon 7- FLI1 exon 5 (342bp)

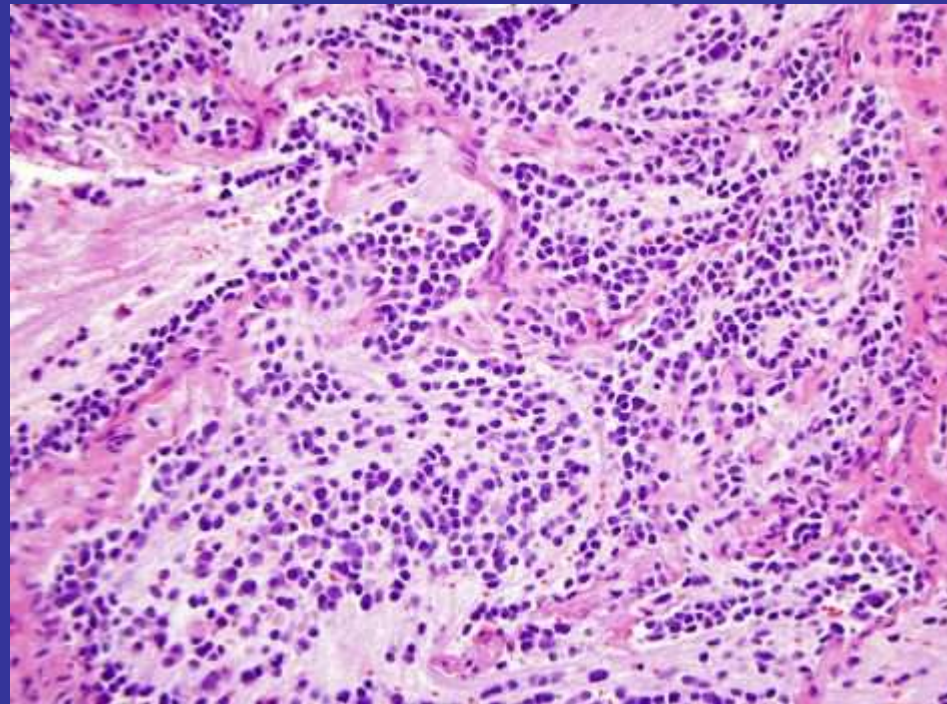
Ligne 3 : EWS exon 7 - FLI1 exon 6 (277bp)

Ligne 2 et 4: EWS exon 7 - FLI1 exon 8 (150bp)

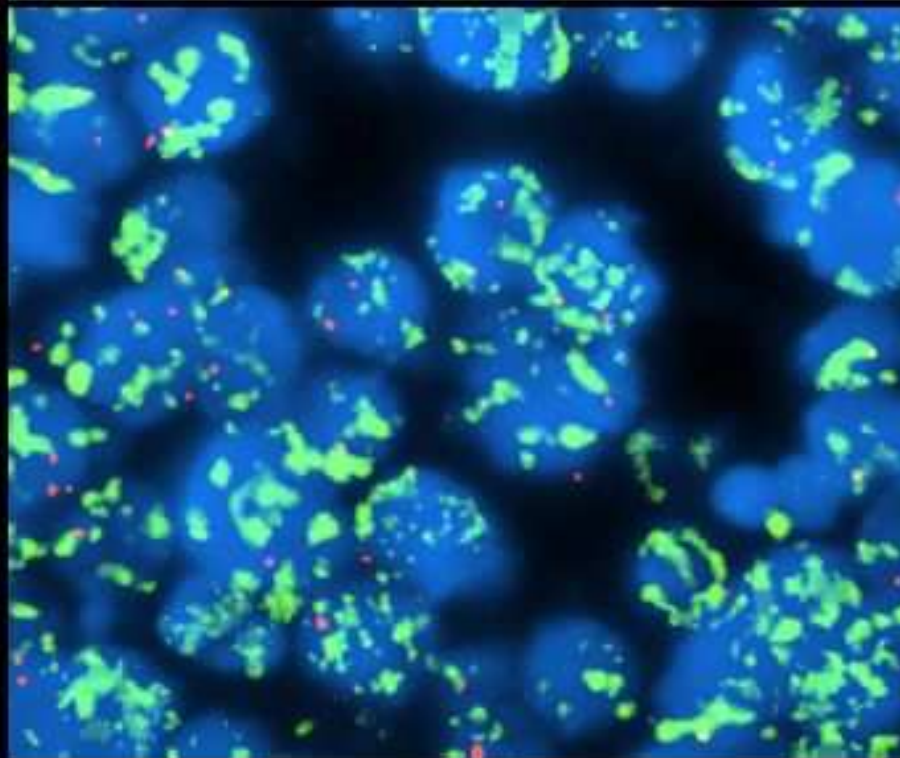


Cas 7

**Garçon de 2 ans avec tumeur surrénalienne
droite**

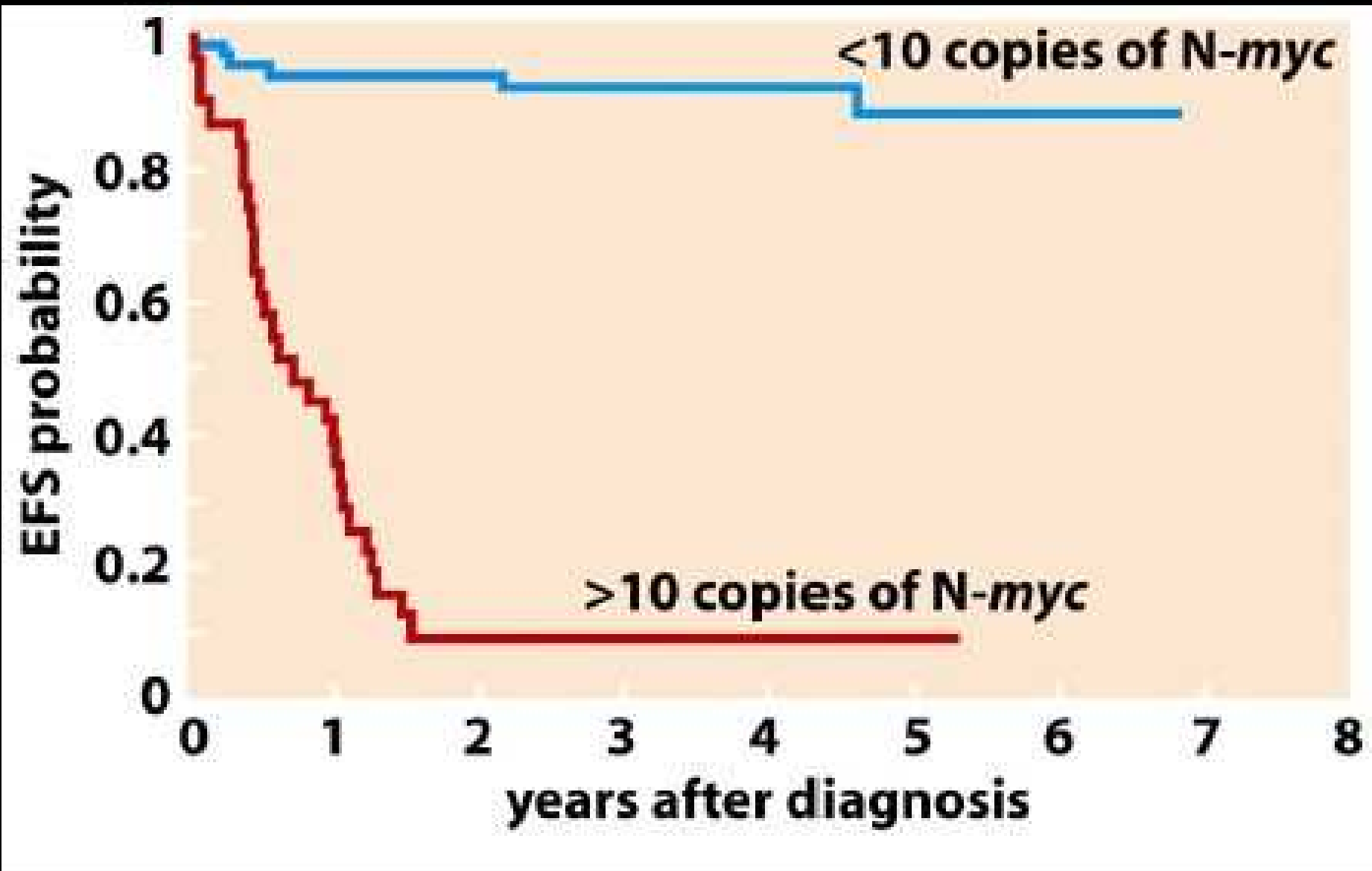


chr2 (p24.3) 21 14 p12 13 94 95



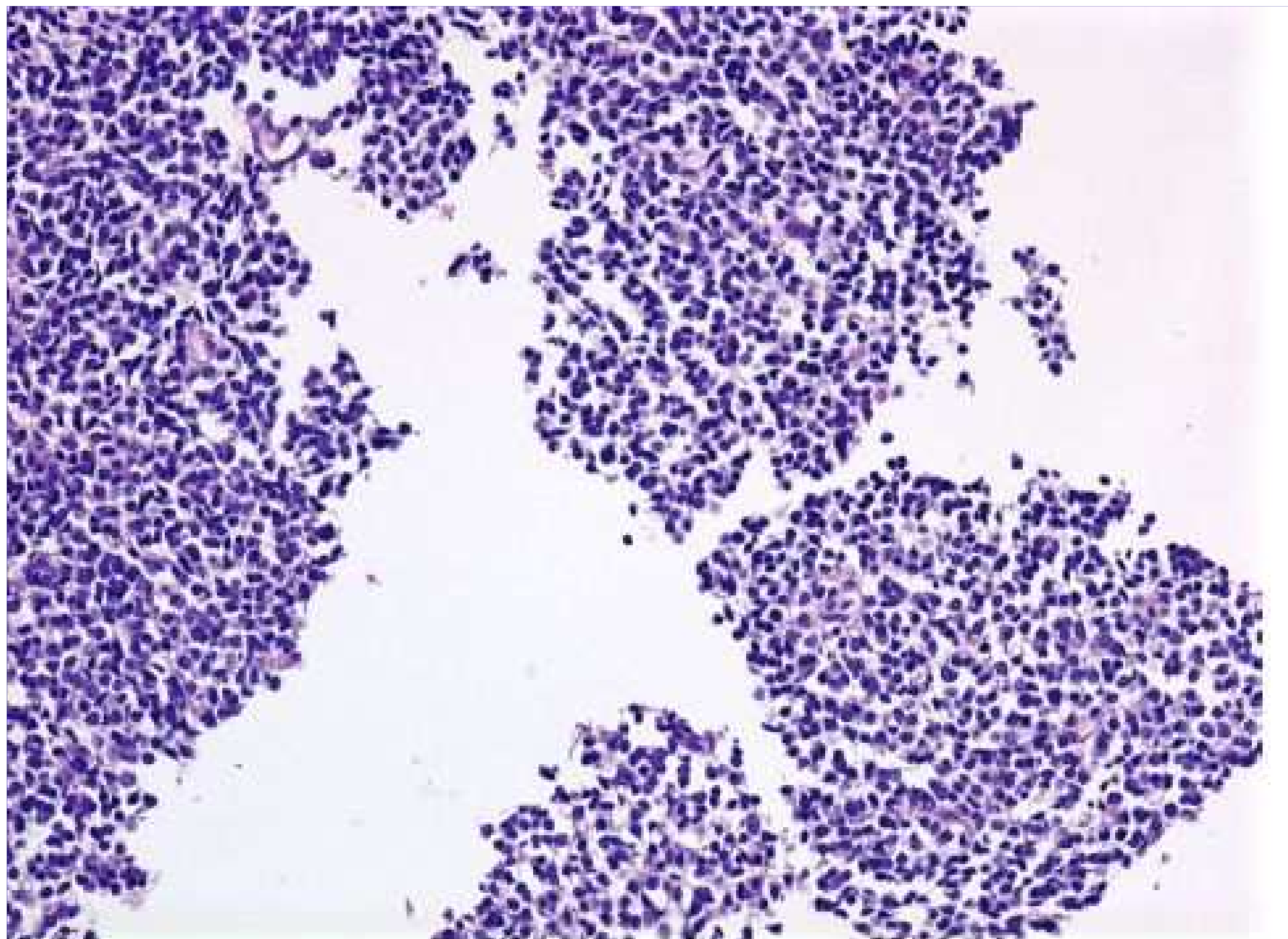
MYCN
CEP2

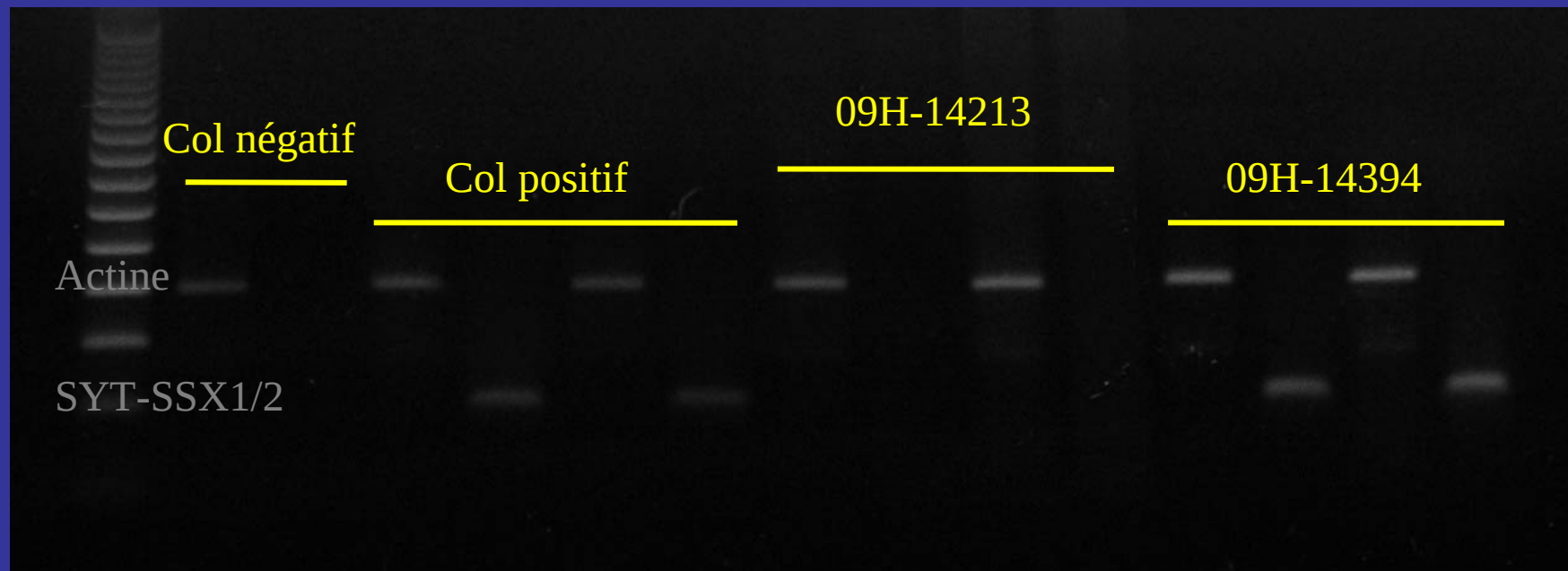
Neuroblastome avec amplification du gène NMYC



Cas 10

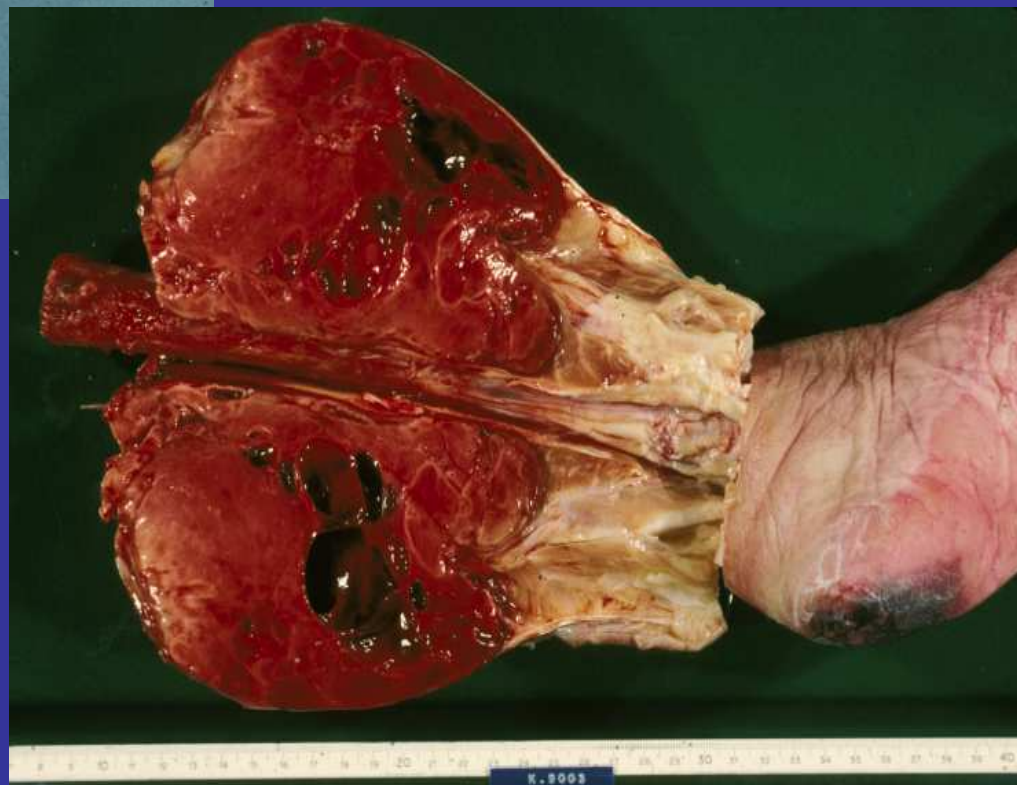
- Femme de 51 ans avec multiples lésions osseuses douloureuses
Biopsie vertébrale : tumeur indifférenciée à cellules rondes
- IHC négative pour cytokératines, EMA, marqueurs lymphoïdes, PS100, ..



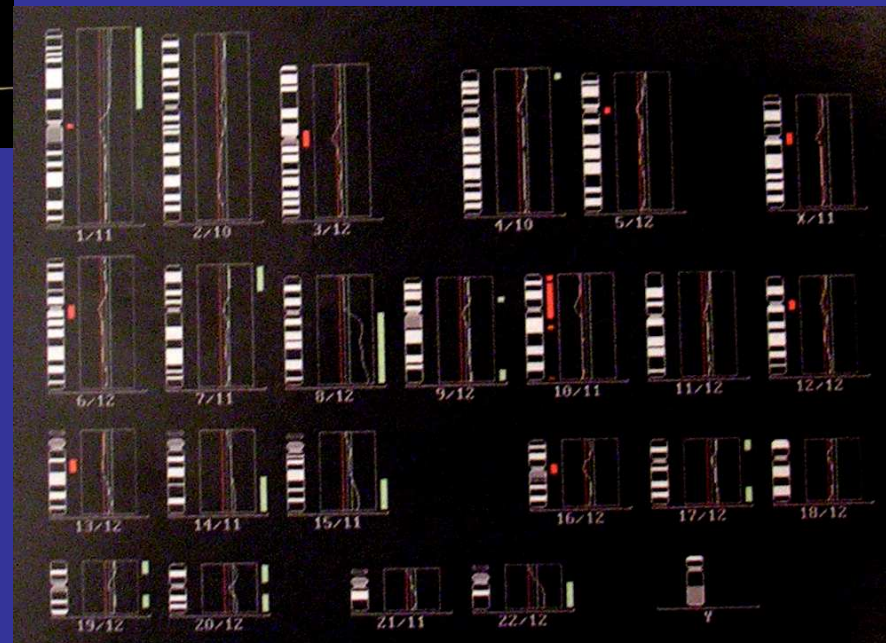
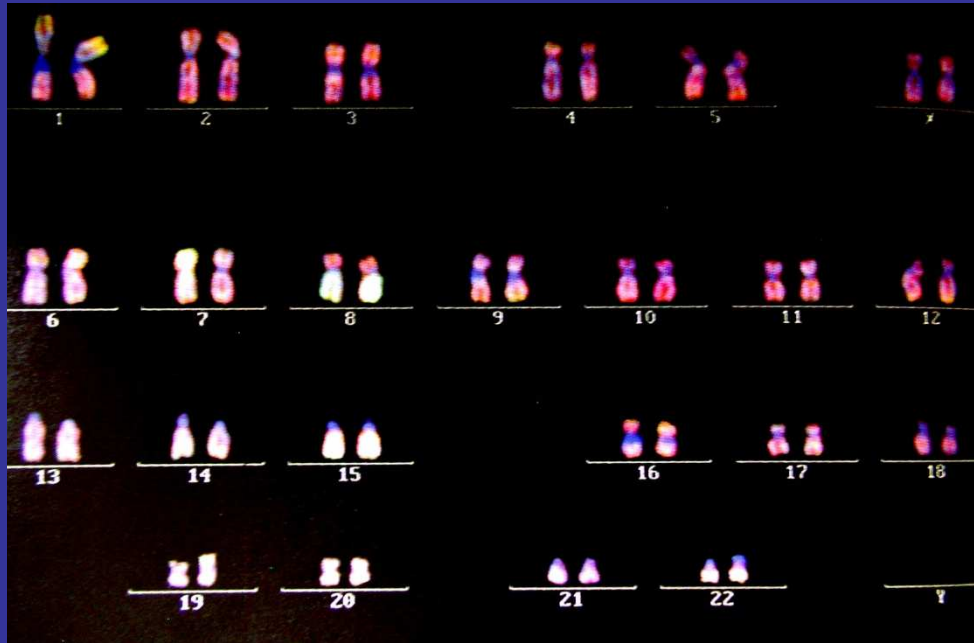


Synovialosarcome métastatique
SYT-SSX2

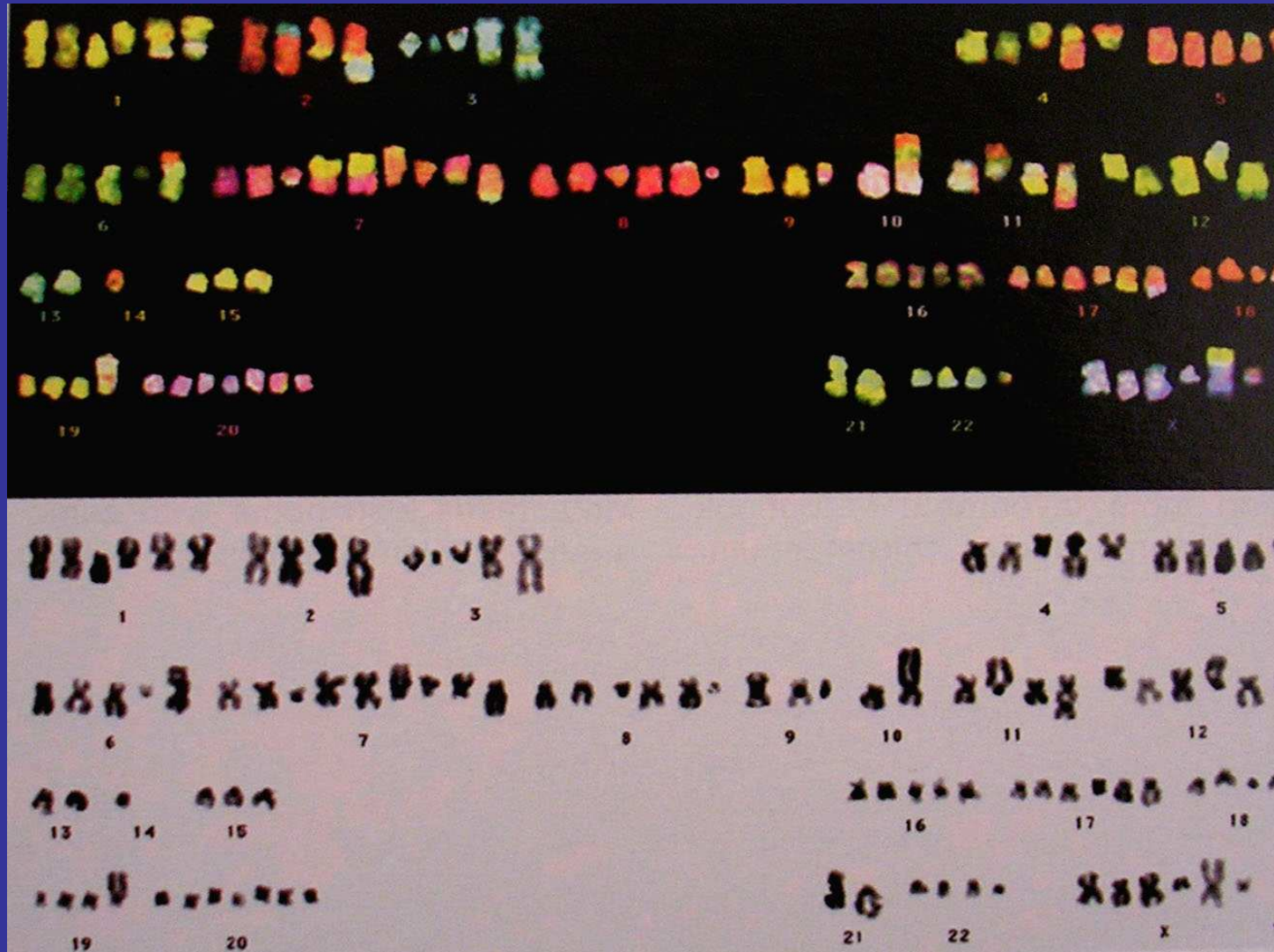
Ostéosarcome



Ostéosarcome : Hybridation Génomique Comparative



Leiomyosarcome : multiples copies de chromosomes et nombreux réarrangements de chromosomes



Le diagnostic des tumeurs osseuses et des tissus mous est un travail d'équipe réunissant médecins oncologues, chirurgiens, radiologues et pathologistes

Ne pas considérer l'anatomie pathologie comme une science divinatoire : donner des renseignements cliniques, joindre une imagerie au prélèvement

Ne pas assimiler la réponse du pathologiste à celle d'un oracle incontestable : la confronter au contexte, la discuter avec son auteur, recommencer la biopsie si nécessaire