



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

RAPPORT D'EVALUATION TECHNOLOGIQUE

Évaluation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour analyse de génétique somatique des cancers

Décembre 2019

Ce rapport d'évaluation technologique est téléchargeable sur
www.has-sante.fr

Haute Autorité de santé

Service communication - information

5, avenue du Stade de France – F 93218 Saint-Denis La Plaine Cedex

Tél. : +33 (0)1 55 93 70 00 – Fax : +33 (0)1 55 93 74 00

Sommaire

Abréviations et acronymes	4
Résumé	5
Introduction	7
1.1 Sources d'information.....	8
1.2 La génétique somatique des cancers	8
1.3 L'acte d'anatomie et de cytologie pathologiques	9
1.4 Les actes N005 et N006	10
2. Champ d'évaluation.....	12
3. Méthodes d'évaluation	13
3.1 Recherche documentaire	13
3.2 Sélection des documents identifiés.....	14
3.3 Recueil du point de vue argumenté des organismes professionnels	17
3.4 Point de vue des patients	17
4. Résultats de l'évaluation	18
4.1 Analyse de la littérature	18
4.2 Place de la sélection et de la qualification des prélèvements et échantillons dans la génétique somatique des cancers.....	19
4.3 Fixation et inclusion en paraffine (N005).....	19
4.4 Cryopréservation (N006)	22
4.5 Synthèse de l'avis des professionnels	25
Conclusion et perspectives	31
Annexe 1. Recherche documentaire.....	34
Annexe 2. Listes des tableaux, graphiques	36
Annexe 3. Grille AGREE II.....	37
Annexe 4. Tableau d'analyse critique avec la grille AGREE II des recommandations de bonne pratique identifiées	38
Annexe 5. Réponse du Conseil National Professionnel des Pathologistes (CNPath) sur l'évaluation de l'acte N005	40
Annexe 6. Réponse du Conseil National Professionnel de Biologie Médicale sur l'évaluation de l'acte N005	44
Annexe 7. Réponse du Conseil national professionnel des pathologistes (CNPath) sur l'évaluation de l'acte N006	50
Annexe 8. Réponse du Conseil national professionnel de biologie médicale sur l'évaluation de l'acte N006	54
Références	59
Fiche descriptive	60

Abréviations et acronymes

ABM	Agence de la biomédecine
ACP	Anatomie et cytologie pathologiques
ADN	acide désoxyribonucléique
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSP	Agence nationale de santé publique (Santé publique France)
ARN	acide ribonucléique
ARS	Agence régionale de santé
AVIQ	Agence pour une vie de qualité
BC CDC	<i>British Columbia Centre for Disease Control</i>
BDSP	Banque de données en santé publique
CCAM	Classification commune des actes médicaux
CDDR	<i>Canada Communicable Disease Report</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIRE	cellules d'intervention en région
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CNP	Conseil national professionnel
CNR	Centre national de référence
DGS	Direction générale de la santé
DGOS	Direction générale de l'offre de soins
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCSP	Haut Conseil de santé publique
HSE	<i>Health Service Executive of Ireland</i>
InVS	Institut de veille sanitaire
LC	Liste complémentaire
NABM	Nomenclature des actes de biologie médicale
OMS	Organisation mondiale de la santé
PHE	<i>Public Health England</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
RIHN	Référentiel des actes innovants hors nomenclature
RT-PCR	<i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>

Résumé

Objectif

L'objectif de ce travail est de préciser l'intérêt, les indications et les modalités de réalisation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomo-cytopathologie, en vue d'une analyse en génétique somatique des cancers.

Méthode

La méthode d'évaluation utilisée dans ce rapport est fondée sur l'analyse critique des données identifiées dans la littérature scientifique et sur le recueil de la position argumentée des professionnels de santé. Une recherche bibliographique a été réalisée entre janvier 2009 et juin 2019, puis une veille a été conduite jusqu'en décembre 2019. Les parties prenantes ont été sollicitées en septembre 2019.

Résultats

Huit recommandations de bonne pratique dont deux françaises, quatre guides techniques et deux articles techniques ont été retenus pour l'évaluation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour l'analyse en génétique somatique des cancers.

La méthode d'élaboration et la qualité méthodologique des recommandations de bonne pratique ont été analysées au moyen de la grille AGREE II.

La majorité des recommandations de bonne pratique analysées s'accordent sur la nécessité de garantir la représentativité et la cohérence entre les résultats d'anatomie pathologique et de génétique, en procédant préalablement à toute analyse de génétique somatique des cancers à une sélection fine des prélèvements qui seront utilisés.

Dans la littérature analysée, aucun élément de nature à remettre en cause les techniques de préparation n'a été identifié. Ces actes techniques sont consensuels et utilisés historiquement. L'observation des tissus mous après fixation en paraffine date du milieu du XIX^e siècle, la cryopréservation est utilisée depuis 1954 et l'utilisation des « microtomes » date de la fin du XVIII^e siècle.

Les professionnels s'inscrivent intégralement dans le consensus qui ressort de l'analyse de la littérature et confirment que toute analyse de génétique somatique sur tissu nécessite une sélection et une préparation de l'échantillon tissulaire.

Sur les conditions de préparation, de qualification et de sélection des échantillons en vue de l'analyse génétique somatique des cancers, les parties prenantes ont cité ou repris les recommandations françaises de la Haute Autorité de Santé de 2009¹ et de l'INCa de 2011² qui restent en vigueur.

Indications

La fixation inclusion peut être réalisée dans les cas suivants :

- Tumeurs solides :
 - tumeurs cérébrales ;
 - tumeurs digestives :
 - cancer colorectal ;

¹ Haute Autorité de santé. Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin. Recommandations de bonne pratique. Saint-Denis La Plaine : HAS ; 2009.

https://www.has-sante.fr/jcms/c_923153/fr/cryopreservation-de-tissus-cellules-et-liquides-biologiques-issus-du-soin

² Institut national du cancer. Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie. Boulogne-Billancourt : INCa ; 2011. <https://www.e-cancer.fr/content/download/63216/569037/file/RECOCRYOTUM11.pdf>

- tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) ;
- tumeurs de l'estomac ;
- tumeurs du syndrome de Lynch ;
- carcinomes pulmonaires ;
- cancers du sein ;
- mélanomes.

À défaut et en l'absence d'alternative, les autres tumeurs solides et lymphomes peuvent être fixés et inclus avant la réalisation d'examen de génétiques.

La cryopréservation peut être réalisée dans l'ensemble des situations de recherche d'altération génétique, mais il n'est pas recommandé de substituer la cryopréservation par la fixation/inclusion dans les cas suivants :

- tumeurs solides et lymphomes :
 - sarcomes ;
 - lymphomes ;
 - tumeurs pédiatriques.
- leucémie et autres hémopathies (hors lymphomes) :
 - LAM ;
 - LAL ;
 - LLC ;
 - LMC ;
 - syndrome myéloprolifératif non LMC ;
 - myélome multiple ;
 - syndrome myélodysplasique.

Dans le cadre de la réalisation de la cryopréservation, une partie de l'échantillon doit faire l'objet d'une observation macroscopique et microscopique visant à qualifier l'échantillon, même s'il est évident que c'est une démarche plus complexe que pour les tissus fixés.

Rendu du résultat

Il est important les résultats de ces actes soient formalisés dans un compte-rendu indiquant :

- l'identification du patient ;
- la description du prélèvement (nature, site, latéralité de l'échantillon, numéro, qualité : taille, présence de tumeur et le cas échéant discordance entre le type observé et le type attendu) ;
- le contexte clinique ;
- la cellularité tumorale ;
- la présence de facteurs confondants éventuels (nécrose, type cellulaire (cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, ...).

À l'issue de la qualification, est réalisée ou validée la sélection des échantillons destinés à l'analyse génétique somatique des cancers.

Conclusion

Au regard de ces éléments, la HAS considère que les actes de préparation, de qualification et de sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomocytopathologie (soit la fixation et l'inclusion en paraffine ou N005, soit la cryoconservation ou N006) sont nécessaires à la bonne analyse de ces échantillons en génétique somatique des cancers.

Introduction

Suite à une saisine conjointe de la Direction générale de l'offre de soins et de la Caisse nationale de l'assurance maladie en date du 29 juillet 2019, il a été demandé à la Haute Autorité de santé d'évaluer deux actes actuellement inscrits sur la liste complémentaire³ du Référentiel des actes innovants hors nomenclature (RIHN), financés provisoirement dans le cadre des MERRI G03⁴, il s'agit de :

- la sélection et préparation d'un échantillon tissulaire fixé et inclus en paraffine pour l'analyse de génétique somatique des cancers (code N005) ;
- la sélection et préparation d'un échantillon tissulaire congelé pour l'analyse de génétique somatique des cancers (code N006).

L'évaluation de la Haute Autorité de santé est réalisée en vue d'apprécier l'opportunité de l'inscription de ces deux actes à la Classification commune des actes médicaux (CCAM) et leur prise en charge par l'Assurance maladie.

Selon les chiffres de la DGOS, le volume enregistré pour l'acte N005 en 2017 était de 69 086 actes pour un montant théorique de 3 868 816 €, et pour l'acte N006, il était de 4 406 pour la même année pour un montant théorique de 370 104 €.

Les actes N005 et N006 sont deux modalités différentes de fixation des échantillons cellulaires ou tissulaires, ils comprennent en outre une qualification et une analyse des caractéristiques anatomocytopathologiques des échantillons afin de sélectionner les pièces et les coupes les plus pertinentes pour l'analyse en génétique somatique des cancers, réalisée en aval.

En conformité avec l'article L6211-2 du Code de la santé publique, les trois phases de déroulement de l'examen sont présentées ci-dessous (cf. figure 1).

³ La liste complémentaire est constituée du stock d'actes en attente d'évaluation et dont le financement a vocation à basculer dans le droit commun (ville ou hôpital) en cas d'évaluation positive par la HAS.

⁴ Dans le cadre de la tarification à l'activité (T2A), la participation des établissements de santé aux missions d'enseignement, de recherche, de référence et d'innovation est financée via des dotations budgétaires spécifiques au titre de missions d'intérêt général (MERRI).

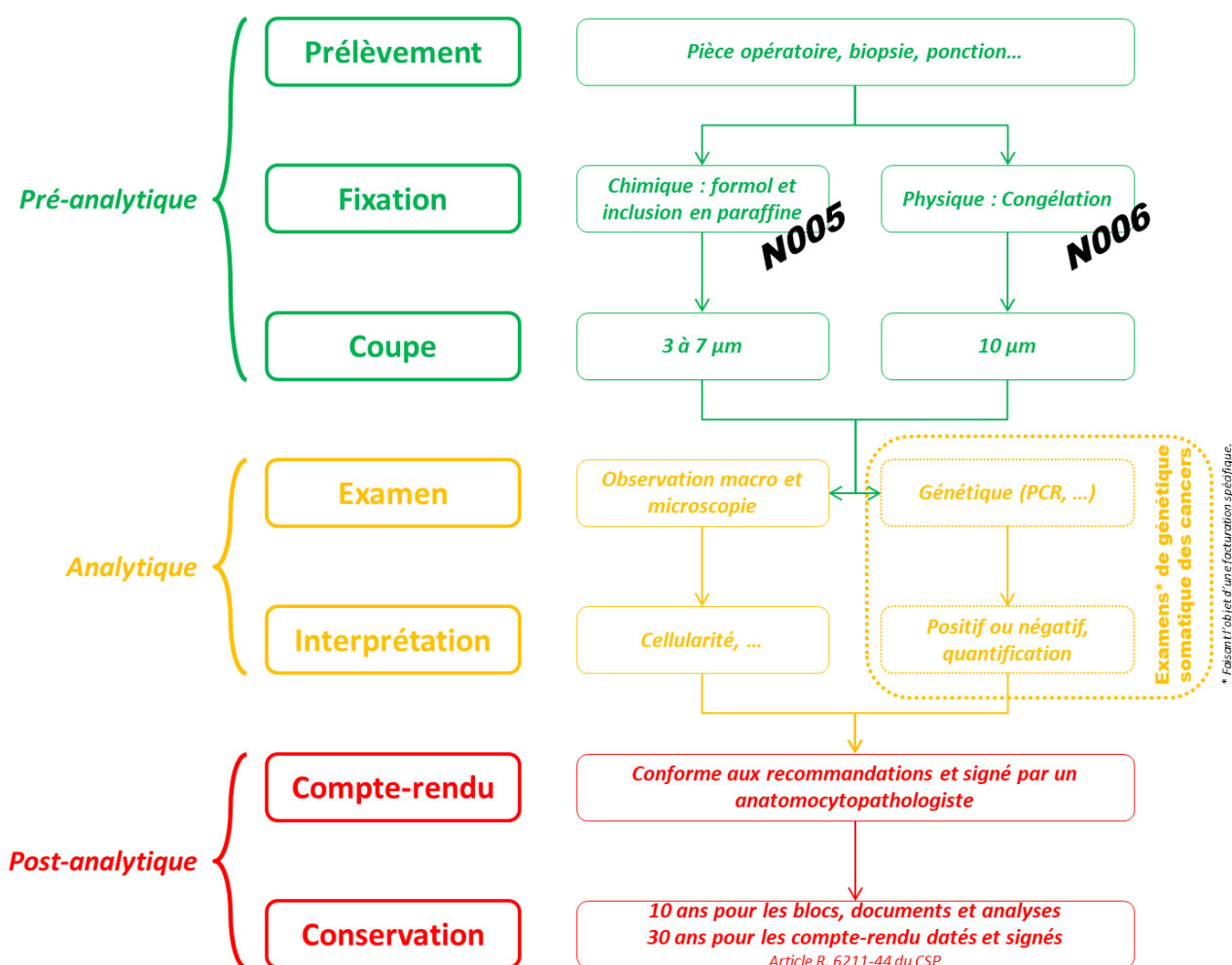


Figure 1. Les phases de réalisation des actes N005 et N006

1.1 Sources d'information

Ce chapitre de contexte a été rédigé à partir d'une revue non systématique de la littérature ayant inclus notamment :

- deux recommandations françaises, l'une de la HAS (1) et l'autre de l'INCa (2) ;
- six recommandations internationales (3-8) ;
- quatre guides techniques (9-12) ;
- deux revues générales (13, 14).

1.2 La génétique somatique des cancers

Dans toute démarche de soins, l'initiation d'une thérapeutique est précédée d'une phase de diagnostic. Pour les cancers, le diagnostic passe notamment par la mise en évidence d'altérations moléculaires qui sont des éléments essentiels à la classification des cancers depuis de nombreuses années (2).

L'analyse en génétique somatique des cancers consiste en l'identification des aberrations génétiques (amplification, délétions, mutation, translocation ou modifications épigénétiques), portées par l'ADN ou l'ARN des tumeurs et apportant des informations indispensables pour le diagnostic ou l'orientation thérapeutique (2).

Les progrès techniques dans l'analyse de la génétique des cancers, notamment l'introduction du séquençage *via* des panels de gènes, ou l'avènement de nouvelles techniques de séquençage haut débit permettant d'avoir accès à l'exome ou au génome entier, ont permis de faire évoluer les classifications et de développer de nouvelles thérapies anti-cancéreuses ciblées (2).

En pratique, l'examen moléculaire peut être effectué à partir de tissus, soit fixés en formol tamponné puis inclus en paraffine, soit à partir de matériel biologique cryopréservé.

Le prélèvement est alors préparé, qualifié et sélectionné avant que ne soit effectuée l'analyse de génétique somatique des cancers.

1.3 L'acte d'anatomie et de cytologie pathologiques

L'acte d'ACP est un acte médical effectué par un médecin spécialiste en ACP. Contrairement à l'acte de biologie médicale, aucun texte législatif ou réglementaire ne définit l'acte d'ACP.

Selon le rapport « Anatomie et cytologie pathologiques » du Ministère du travail, de l'emploi et de la santé en date du 15 avril 2012 (15), l'acte d'ACP est : « un examen diagnostique, basé sur l'observation morphologique, notamment au microscope. Il s'appuie sur des techniques, standards ou spéciales, macroscopiques, histopathologiques, histochimiques, immunohistochimiques ou moléculaires. Il porte sur des cellules, tissus, organes ou leurs dérivés, prélevés chez les patients dans un but diagnostique de maladie ou de dépistage (prélèvements cytologiques ou biopsiques), thérapeutique (biopsies, exérèses ou pièces opératoires) ou de suivi particulier. Il est aussi pronostique *via* le recueil des éléments clés de la réalisation de grade ou scores ; prédictif et à impact thérapeutique (théranostic, médecine personnalisée, parcours personnalisé de soins). Il est formalisé par un compte-rendu textuel transmis aux médecins en charge du patient dans le cadre du soin ».

1.3.1 Processus analytique

Un examen d'anatomie et cytopathologie se déroule en trois phases (9).

► Pré-analytique

La phase pré-analytique est définie comme le début du processus analytique qui commence par la prescription des examens par le clinicien, l'identification du patient et le recueil des éléments cliniques pertinents, le prélèvement de l'échantillon primaire sur le patient et sa préparation, son acheminement jusqu'au laboratoire et sa conservation jusqu'au début de l'analyse.

► Analytique

La phase analytique recouvre l'ensemble des processus techniques concourant à l'obtention du résultat de l'analyse.

► Post-analytique

Enfin, la phase post-analytique comprend l'interprétation des résultats, leur communication au médecin prescripteur et au patient, la conservation et le stockage des échantillons biologiques, la mise au rebut des déchets biologiques et la conservation des résultats d'examens.

1.3.2 Assurance qualité

L'assurance de la qualité recouvre l'ensemble des dispositions prises pour donner confiance en ce que les exigences pour la qualité seront satisfaites (16).

Contrairement aux laboratoires de biologie médicale, les structures d'ACP ne sont pas juridiquement soumises à une accréditation obligatoire. Néanmoins, les médecins spécialisés en ACP sont invités à se conformer aux recommandations de bonne pratique de l'Association française

d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques (AFAQAP), organisme de médecins spécialisés en ACP.

L'utilisation de contrôle qualité interne aux laboratoires et la participation à des programmes de contrôle qualité externe sont préconisées par l'AFAQAP. En 2019, l'AFAQAP propose 29 tests d'évaluation externe de la qualité (EEQ). Tous les tests d'EEQ proposés peuvent bénéficier à la structure d'ACP pour faire valoir son engagement dans une démarche d'accréditation selon les exigences de la norme ISO 15189⁵.

Les parties prenantes⁶ sollicitées dans le cadre de cette évaluation, ont ainsi confirmé que « les contrôles internes (contrôle de la cellularité, concordance avec les résultats moléculaires) sont souhaitables. Les contrôles externes sont à organiser ».

1.3.3 Aspects réglementaires

Sur l'obligation d'accréditation, il existe une divergence réglementaire entre les laboratoires de biologie médicale et ceux d'ACP. Si pour les premiers, cette démarche est obligatoire et s'inscrit dans un processus réglementaire initié par l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, pour les seconds, c'est une démarche volontaire (17).

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale repose sur norme ISO 15189, l'accréditation des structures d'ACP repose également sur cette norme complétée d'une adaptation à la pratique de l'ACP sous la forme d'un guide technique d'accréditation en anatomie et cytologie pathologiques (SH GTA 03) du Cofrac (9).

La préparation et la qualification d'un échantillon tissulaire ou cellulaire relève d'un acte d'ACP pouvant notamment impliquer la réalisation d'analyses en génétique somatique des cancers. Lorsque ces analyses sont conduites dans des laboratoires de biologie médicale qui ont l'obligation d'être accrédités (obligation au 1^{er} novembre 2020 d'obtenir l'accréditation pour la totalité de leur activité, contre 50 % au 31 décembre 2017), la maîtrise des processus pré-analytiques nécessite une accréditation *a minima* sur les familles d'acte de préparation et qualification que nous évaluons.

1.4 Les actes N005 et N006

1.4.1 Définition

Les actes N005 et N006 de la liste complémentaire sont définis,

- pour l'acte N005, comme la sélection et la préparation d'un échantillon tissulaire fixé et inclus en paraffine ; cet acte comprend en outre la qualification et l'analyse des caractéristiques anatomocytopathologiques des échantillons afin de sélectionner les pièces et les coupes les plus pertinentes pour l'analyse en génétique somatique des cancers réalisée en aval ;
- pour l'acte N006, comme la sélection et la préparation d'un échantillon tissulaire congelé ; cet acte comprend en outre la qualification et l'analyse caractéristiques anatomocytopathologiques des échantillons afin de sélectionner les échantillons les plus pertinents pour l'analyse en génétique somatique des cancers réalisée en aval.

Les conditions de réalisation de ces deux actes seront décrites dans la partie Résultats de l'évaluation, leur définition constitue un des objectifs de ce travail (cf. chapitre 4).

⁵ <https://www.afagap.fr/eeq/campagne-2018/eeq-2018>.

⁶ CNPath et CNPBM.

1.4.2 Conditions actuelles de prise en charge

Comme indiqué en introduction, ces deux actes sont inscrits sur la liste complémentaire du RIHN et sont actuellement financés provisoirement dans le cadre des MERRI G03⁴ selon les conditions fixées ci-dessous :

Tableau 1. Libellé et valorisation des actes N005 et N006

Code LC	Libellé de l'acte de la liste complémentaire	Valorisation	Commentaire
N005	Sélection et préparation d'un échantillon tissulaire fixé et inclus en paraffine pour analyse de génétique somatique des cancers	56,00 €	Inclut le compte-rendu signé par un anatomo-cytopathologiste
N006	Sélection et préparation d'un échantillon tissulaire congelé pour analyse de génétique somatique des cancers	84,00 €	Inclut le compte-rendu signé par un anatomo-cytopathologiste

2. Champ d'évaluation

La phase pré-analytique des deux actes N005 et N006 (cf. Figure 1) relève d'actes techniques consensuels et utilisés historiquement, l'utilisation des « microtomes » date de la fin du XVIII^e siècle, et l'observation des tissus mous après fixation en paraffine du milieu du XIX^e siècle, la cryopréservation est, quant à elle, utilisée depuis 1954.

L'objectif de ce travail n'est pas d'évaluer l'intérêt des techniques de préparation des échantillons mais de préciser leurs conditions optimales de réalisation, ainsi que les critères de sélection et de qualification des échantillons en vue de l'analyse de la génétique somatique des cancers réalisée en aval (cf. Figure 1).

Le travail de la HAS portera également sur la définition des indications de ces deux actes.

3. Méthodes d'évaluation

La méthode d'évaluation utilisée pour réaliser cette évaluation est la suivante :

- recherche systématique de la littérature synthétique et des recommandations de bonne pratique analyse critique des publications sélectionnées ;
- recueil du point de vue argumenté d'organismes professionnels interrogés comme parties prenantes au moyen d'un questionnaire.

3.1 Recherche documentaire

Dans une recherche préliminaire, une littérature très abondante mais non informative a été identifiée. Ceci s'explique par le fait que les techniques de préparation sont largement validées en ACP et qu'elles sont essentiellement décrites dans la partie matériel et méthodes des articles.

Concernant, l'intérêt, la définition des conditions de réalisation et les indications des deux actes évalués, deux recommandations de bonne pratique françaises ont été identifiées. Il s'agit de celles de l'INCa de 2011 (2) portant sur la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie et de celle de la HAS de 2009 (1) portant sur la cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin. Ces deux recommandations répondant majoritairement aux questions posées dans ce rapport, la recherche de la littérature a ainsi été restreinte aux recommandations, consensus de professionnels publiés sur la période 2009-2019 et permettant de réactualiser les données issues de ces deux documents. Ce travail faisant par ailleurs appel à des notions très techniques, la recherche de la littérature a été complétée par les guides et articles techniques spécifiques publiés sur la même période.

3.1.1 Bases automatisées de données bibliographiques

► Liste des bases interrogées

Les bases bibliographiques suivantes ont été interrogées dans le cadre d'une recherche systématique (voir Annexe 1), cette recherche a été complétée par une recherche manuelle des références citées dans les documents analysés ;

- la base de données *Medline* ;
- la base de données *Embase* ;
- Science Direct (Elsevier) ;
- la *Cochrane Library* ;
- la base de données Pascal ;
- la base de données Lissa (Littérature scientifique en santé) ;
- la base de données *Lilacs* (*Latin-American and Caribbean System on Health Sciences Information*) ;
- la Banque de Données en Santé Publique (BDSP).

► Stratégie d'interrogation des bases et résultats

La stratégie d'interrogation est détaillée dans l'Annexe 1.

La recherche a porté sur la période de janvier 2008 à juin 2019. Une veille documentaire a été réalisée jusqu'en novembre 2019.

Cette recherche a permis d'identifier **103 documents**.

3.1.2 Sites Internet

► Liste des sites consultés

La liste des sites consultés est présentée en Annexe 1.

► Stratégie d'interrogation et résultats

Les sites Internet ont été interrogés en fonction des modalités de recherche propres à chacun : consultation de la liste des publications et/ou requête dans le moteur de recherche avec des mots-clés. Elle a eu lieu en septembre 2019 et a couvert la période de janvier 2008 à juin 2019. Une veille documentaire a été réalisée jusqu'en novembre 2019 (la veille est effectuée jusqu'au passage en Collège).

3.2 Sélection des documents identifiés

La recherche bibliographique présentée ci-dessus a permis d'identifier **96 documents** (hors doublons).

À la lecture des titres et résumés, les documents présentant les caractéristiques suivantes ont été retenus :

- décrivant les techniques de fixation en vue de la réalisation d'examens de génétique ;
- décrivant les techniques d'inclusion en paraffine en vue de la réalisation d'examens de génétique ;
- décrivant les techniques de cryopréservation en vue de la réalisation d'examens de génétique ;
- comparant différents techniques de fixation ;
- évaluant l'impact de la durée de conservation des prélèvements ;

Cette première sélection a permis de retenir **28 documents**.

Une seconde sélection a ensuite été réalisée sur les publications *in extenso*, elle a permis de retenir les documents répondant aux critères présentés dans le Tableau 2 et d'exclure les études :

- dont la technique avait pour vocation la réalisation d'examens de génétique en infectiologie ;
- dont la technique avait pour vocation la réalisation d'examens de génétique sur des maladies héréditaires ;
- dont la technique avait pour vocation la réalisation d'examens de génétique hors du champ de la génétique somatique des cancers ;
- couvrant les aspects réglementaires déjà inclus dans les recommandations institutionnels.

Au terme de la sélection, quatorze **documents** ont été retenus.

Tableau 2. Présentation des critères de sélection

Problématique	Réalisation d'analyses génétiques et génomiques	Réalisation d'analyses génétiques et génomiques	Choix de la méthode de fixation conservation en fonction du rendement et de la stabilité des acides nucléiques
Patients	Patient en attente de diagnostic. Patient atteint d'un cancer en attente d'un statut mutationnel. Patient atteint d'un cancer en rechute avec recherche d'une sélection clonale.	Patient en attente de diagnostic. Patient atteint d'un cancer en attente d'un statut mutationnel. Patient atteint d'un cancer en rechute avec recherche d'une sélection clonale.	Patient en attente de diagnostic. Patient atteint d'un cancer en attente d'un statut mutationnel. Patient atteint d'un cancer en rechute avec recherche d'une sélection clonale.

Problématique	Réalisation d'analyses génétiques et génomiques	Réalisation d'analyses génétiques et génomiques	Choix de la méthode de fixation conservation en fonction du rendement et de la stabilité des acides nucléiques
Intervention	Fixation et inclusion d'échantillons de cancers en paraffine en vue de la réalisation d'analyse de génétique des cancers	Cryoconservation d'échantillons de cancers en vue de la réalisation d'analyse de génétique des cancers	Fixation et inclusion ou cryoconservation d'échantillons de cancers en paraffine en vue de la réalisation d'analyse de génétique des cancers
Comparateurs	Principal : Autres fixateurs (formolés ou non) Autres matériaux d'inclusion (celloïdine, résines plastiques, ...)	S. O.	Principal : l'autre technique

L'ensemble du processus de sélection des documents identifiés est résumé dans le schéma ci-dessous (Cf. Figure 2).

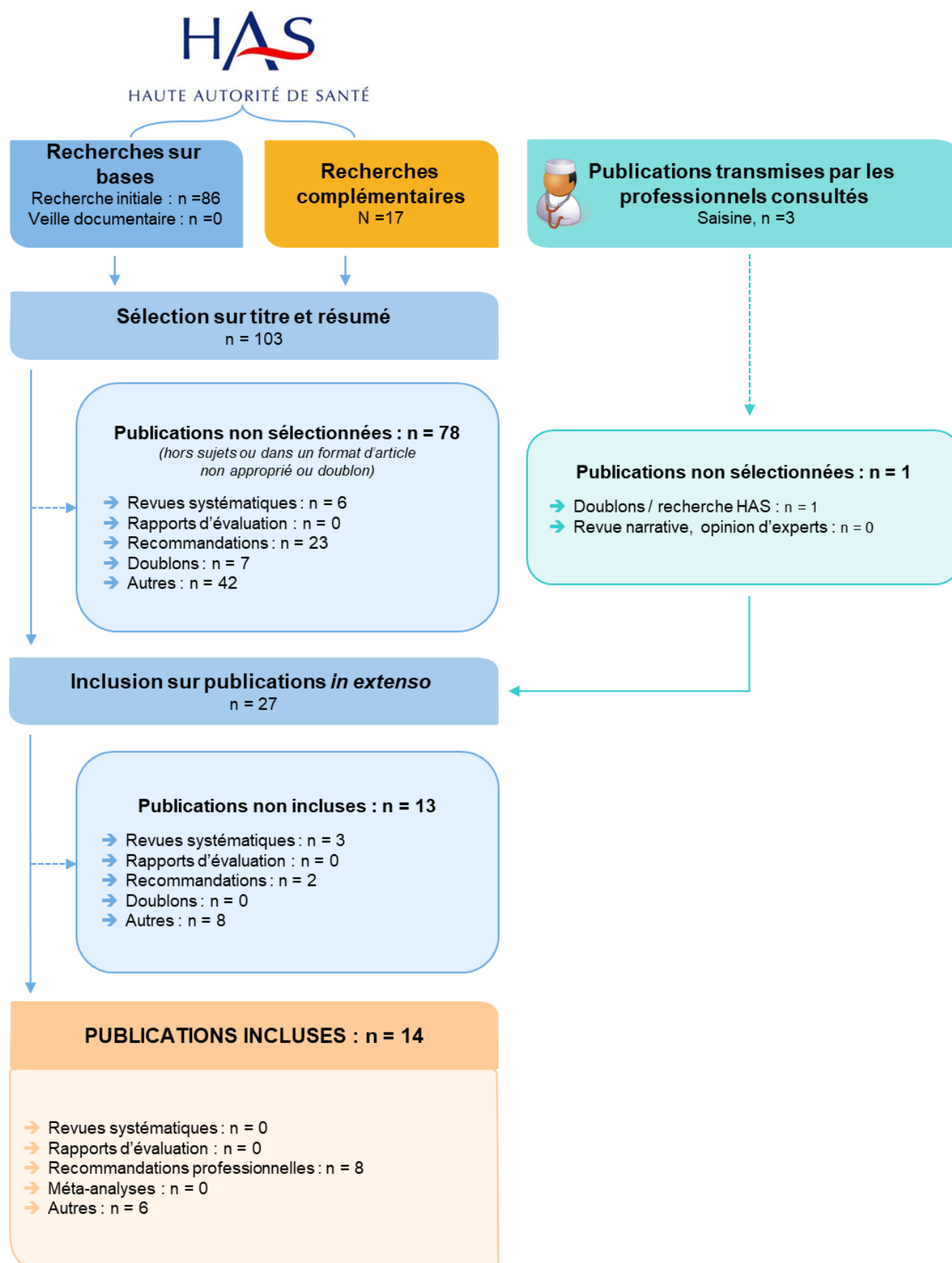


Figure 2. Organigramme du processus de sélection de la recherche documentaire

3.3 Recueil du point de vue argumenté des organismes professionnels

3.3.1 Liste des organismes sollicités

S'agissant d'actes très techniques réalisés en phase pré-analytique en amont de l'analyse génétique somatique des cancers, seul le point de vue des spécialités impliquées dans leur réalisation/utilisation a été recherché.

Cette consultation a été menée conformément à la procédure de consultation des parties prenantes mise en place par la HAS⁷, auprès des groupes concernés, ou susceptibles de l'être, par les conséquences de cette évaluation.

La liste des organismes contactés est présentée dans le tableau ci-après.

Tableau 3. Liste des organismes interrogés par champ disciplinaire

Champ disciplinaire	Organisme
Anatomie et cytologie pathologiques	Conseil national professionnel des pathologistes (CNPath)
Biologie	Conseil national professionnel de biologie médicale

3.3.2 Modalités de consultation

Le représentant ou président de chacun des organismes a été directement sollicité afin que le groupe professionnel qu'il représente exprime son point de vue argumenté. Il lui a été adressé à cette fin deux questionnaires ouverts couvrant les deux actes N005 et N006, ainsi qu'une lettre d'accompagnement explicative.

Cette consultation a été conduite entre le 20 septembre et le 7 octobre 2019.

Les réponses sont intégralement reproduites dans les Annexe 5, Annexe 6, Annexe 7, et Annexe 8 de ce rapport.

Une synthèse de ces réponses, réalisée par la HAS, a été intégrée à l'argumentaire, elle figure dans le chapitre 4.5 de ce document.

3.4 Point de vue des patients

Cette évaluation présentant un caractère très technique, il n'a pas été jugé pertinent de solliciter les associations de patients.

⁷ Décision n°2014.0115/DC/MJ du 28 mai 2014 du collège de la Haute Autorité de santé portant adoption de la procédure de consultation des parties prenantes. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-09/c_2014_0115_adoption_procedure_parties_prenantes.pdf.

4. Résultats de l'évaluation

4.1 Analyse de la littérature

4.1.1 Présentation et analyse critique des documents

L'ensemble des documents sélectionnés et analysés sont présentés dans l'Annexe 4, il s'agit de :

- huit recommandations (1-8) ;
- quatre guides techniques (9-12) ;
- deux articles techniques (13, 14).

Tous ces documents portent sur la préparation, la qualification, la sélection et la conservation d'échantillons, en vue de la réalisation d'examen de génétique des cancers, ainsi que sur la dimension d'assurance qualité relative à chacune de ces étapes.

Concernant les recommandations de bonne pratique, aucune n'est internationale, trois recommandations sont nord-américaines (6, 7, 12), une japonaise (4), une britannique (8), deux européennes (associant plusieurs pays) (3, 5) et enfin, deux recommandations françaises issues des travaux de la HAS (1) et de l'INCa (2).

La méthode d'élaboration de l'ensemble des recommandations retenues et l'évaluation de leurs qualités méthodologiques ont été analysées à l'aide de la grille AGREE ; les résultats de cette analyse sont présentés en Annexe 4. Ils sont issus d'une application stricte de la grille AGREE II. Néanmoins, il convient de préciser que certains items (notamment sur la prise en compte des opinions et préférences des patients, sur les bénéfices ou effets secondaires) ne peuvent s'appliquer aux recommandations portant sur des actes techniques de biologie ou d'ACP, ce qui a pu affecter les scores obtenus pour certains champs de la grille.

Au final, cette analyse a permis de conclure pour l'ensemble des recommandations analysées à une bonne, voire à très bonne qualité méthodologique d'élaboration.

La recommandation européenne de 2013 de Hastings *et al.* (3) est une adaptation et implémentation partielle de la norme 15189 aux impératifs de l'ACP, notamment dans le cadre d'axes fixés par le comité qualité de l'*European Society of Human Genetics*. Elle a été réalisée lors du Congrès « *Tumor Best Practice* » en 2013 à Oxford, avec le soutien du groupe de professionnels de l'analyse génétique *EuroGentest*. Elle formule des recommandations par typologie d'examen.

La recommandation de la *Japanese Society of Medical Oncology* (4) porte spécifiquement sur la recherche de mutations en génétique somatique des cancers colorectaux (de deux protéines de la famille RAS : KRAS et NRAS). Cette recommandation porte sur un test-compagnon contre-indiquant l'utilisation des anti-EGFR. Cette recommandation traite, pour la phase pré-analytique de ce test-compagnon, de l'utilisation des tissus fixés et inclus en paraffine.

La recommandation de l'INCa (dans sa version révisée de 2011) (2) porte sur la conservation (dont la cryopréservation) des tissus, cellules et liquides biologiques, en vue de la réalisation d'examens (incluant la génétique somatique des cancers). Cette recommandation formule les indications pour chaque type de conservation et de prélèvement. Cette recommandation présente également des éléments hors du champ de notre évaluation, notamment la mise en place des tumorothèques et les modalités d'utilisation des échantillons tumoraux à des fins de recherche.

Le guide de bonne pratique de l'AFAQAP en 2009 (11) et l'annexe 7 de cette recommandation (10) définit les bonnes pratiques en matière d'ACP et précise par ailleurs la gestion des tissus inclus en paraffine.

La recommandation de la HAS de 2009 (1) porte sur la cryopréservation des tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, elle définit les modalités et procédures de cryopréservation en fonction des situations et des types d'échantillons.

Les deux recommandations nord-américaines issues du *College of American Pathologists* et de la *National Society for Histotechnology* (2014 (6), 2015 (7), et un guide technique issu des mêmes organismes, 2018 (12)), portent sur les examens provenant des exérèses chirurgicales (organes ou biopsie). Ces recommandations très documentées et référencées abordent en détail les examens de qualification des prélèvements indispensables à la réalisation complète des actes N005 et N006.

La recommandation britannique, émise par le *Royal College of Pathologists* en 2009 (8), avait pour objectif la standardisation de la conservation des échantillons et des données à des fins médico-légales et réglementaires. Elle porte spécifiquement sur la conservation (échantillons, blocs, lames, lames numérisées, rapports, ...).

4.2 Place de la sélection et de la qualification des prélèvements et échantillons dans la génétique somatique des cancers

La majorité des recommandations de bonne pratique analysées (1-5, 10, 11) s'accordent sur la nécessité de garantir la représentativité et la cohérence entre les résultats d'anatomie pathologique et de génétique en procédant, préalablement à toute analyse de génétique somatique des cancers, à une sélection fine des prélèvements qui seront utilisés :

- soit lors du prélèvement par le médecin préleveur, particulièrement pour les biopsies « précieuses » (biopsie pulmonaire, ...) (2) ;
- soit par le pathologiste sur les exérèses ou prélèvement d'organes ou de biopsies, destinés à la congélation ou à l'inclusion en paraffines (2, 3, 5, 10).

Les recommandations françaises et nord-américaines (5, 10) sont unanimes sur l'obligation de choisir pour un prélèvement donné un ou plusieurs échantillons présentant un nombre suffisant de noyaux tumoraux, de manière à éviter les faux négatifs. Ce choix peut être réalisé soit par la sélection d'échantillons avec une surface tumorale plus importante, comme indiqué dans la recommandation japonaise qui préconise des échantillons dont la surface de section est occupée à 50 % ou plus par des cellules tumorales (4), soit en retenant les échantillons avec une cellularité forte (≥ 30 %) (la notion de cellularité étant définie comme un nombre total de cellules tumorales viables rapportées au nombre total de cellules), comme préconisé dans les recommandations françaises (10).

Dans la majorité des recommandations, il est indiqué que **la qualification / sélection de l'échantillon** doit limiter au maximum les éléments pouvant réduire la qualité des acides nucléiques ; comme la présence de cellules en apoptose (4), en nécrose (3-5, 10), de mucus (10), ou les paramètres susceptibles d'interférer avec les techniques de biologie moléculaire (comme les tubes avec l'héparinate de lithium (2, 5), en raison de la présence de lithium qui est un inhibiteur des ADN polymérases).

L'ensemble de ces informations doit être tracé (2, 5, 10).

4.3 Fixation et inclusion en paraffine (N005)

Selon les recommandations françaises de la HAS (1) et de l'INCa (2), la fixation et l'inclusion des tissus ou cellules en paraffine est une alternative possible à **la cryopréservation qui demeure la modalité de conservation à privilégier en vue de la réalisation d'examens de génétique sur les cancers**. Dans la recommandation japonaise (4), il est indiqué que l'utilisation de tissus fixés est largement répandue, notamment pour la recherche de mutation de gène codant pour les protéines NRAS et KRAS.

Il convient, par ailleurs, de préciser que l'utilisation de l'acte de fixation et inclusion en paraffine est généralisée. Il est ainsi très simple de pouvoir disposer des échantillons ; de plus, l'échange de bloc est très commode et les conditions de conservation sont non contraignantes (2, 6, 8-12).

L'acte N005 (fixation et inclusion en paraffine) qui conduit au-delà de la fixation et inclusion en paraffine à un compte-rendu avec une qualification de l'échantillon (résultat), peut par analogie être considéré comme un processus d'analyse à trois phases (9, 11). Néanmoins, cet acte n'a pas pour vocation de permettre d'établir un diagnostic, il est dans les faits déclenché par la demande d'un examen de génétique somatique des cancers, mais il n'est jamais prescrit directement par le clinicien (9).

► Conditions de réalisation

Pré-analytique

Dans les référentiels réglementaires et normatifs français, il est indiqué que la demande d'examen doit être formalisée dans un bon présentant, outre les gènes à séquencer ou les mutations à rechercher (2, 11), l'identification du patient, la description du prélèvement (nature, site, latéralité de l'échantillon, numéro du prélèvement en cas de train d'échantillons), le contexte clinique, le type de cancer attendu, ainsi que l'horodatage du prélèvement et, le cas échéant, celle du début de la fixation (2, 9, 11).

Deux grandes étapes techniques permettent de passer du prélèvement à l'échantillon inclus.

La fixation

Elle a pour but la conservation des structures des pièces tissulaires. Il est impératif qu'elle intervienne dès le prélèvement par immersion de l'échantillon dans une quantité suffisante de fixateur (5) ; dans les recommandations américaines, il est préconisé un volume vingt fois plus important (6, 7, 12).

Dans la majorité des recommandations analysées, il est uniformément préconisé l'utilisation de formol tamponné (2), même si elles peuvent diverger sur le pourcentage de dilution recommandé. Certaines proposent du formol tamponné à 4 % (5, 10), mais celles-ci ne sont pas spécifiques à l'analyse génétique des cancers ; les recommandations nord-américaines et la recommandation japonaise, orientée spécifiquement vers la génétique, conseillent, quant à elles, de privilégier l'utilisation du formol tamponné à 10 % (4, 6, 12).

Tous les autres fixateurs formolés (liquide de Bouin ou l'AFA), possédant dans leurs compositions des acides (acides picrique et acétique pour le liquide de Bouin et l'acide acétique pour l'AFA), sont déconseillés (2) : ils induisent une réduction du pH conduisant à la dégradation des acides nucléiques (11, 14).

Cette **première étape de fixation** peut être effectuée de manière délocalisée au moment du prélèvement ; ainsi, il convient que les protocoles soient clairement établis et formalisés lors de la contractualisation entre le service demandeur et le laboratoire (9, 11).

Dans les recommandations françaises (2), il est indiqué qu'il est important de respecter un temps et la procédure de fixation indiqués dans les protocoles validés et les délais d'acheminement vers le laboratoire (8, 10), car le taux de résultats non conclusifs augmente avec le temps de conservation et peut être limité par des conditions optimales de technique (13).

L'inclusion

L'inclusion en paraffine a pour but de faciliter la réalisation des coupes et de les rendre reproductibles en routine (10). D'autres matériaux d'inclusion ont été identifiés dans la littérature (celloïdine, résines plastiques, ...) et sont des comparateurs potentiels de la paraffine, mais sortent du champ de cet acte qui se limite à la paraffine.

La paraffine étant hydrophobe, il faut déshydrater le prélèvement par des bains de concentrations croissantes d'alcool puis par un solvant Toluène ou Xylène (5, 6, 12), avant d'effectuer l'inclusion proprement dite dans de la paraffine fondue, ces étapes sont souvent automatisées. Après durcissement, le bloc peut être utilisé et conservé pour la qualification et pour les techniques de génétique somatique des cancers.

Analytique

Lors de la réception de l'échantillon fixé ou non, il convient de tracer l'ensemble des étapes en indiquant l'horodatage et en identifiant les personnes effectuant la technique (2, 9, 10).

Cette étape dans le cadre de l'acte N005 doit conduire à la qualification de l'échantillon en identifiant les critères suivants :

- la description du prélèvement (nature, observation macroscopique : taille, présence de tumeur et, le cas échéant, la discordance entre le type observé et le type attendu) (2, 9, 10) ;
- la cellularité tumorale (5, 10) ;
- la présence de facteurs confondants éventuels (nécrose, type cellulaire (cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, ...)) (2-5, 10).

Une étude française de Uguen *et al.* de 2016 a montré que le taux d'analyses non conclusives pouvait être relativement élevé de l'ordre de 5 à 10 % et majoré par deux facteurs : la durée de la conservation et la qualité de la fixation (13).

Post-analytique

Dans les normes et recommandations françaises (2, 9, 10), il est indiqué qu'il est nécessaire de faire un compte-rendu (y compris interne au laboratoire) indiquant à minima :

- l'identification du patient (2, 9, 10) ;
- la description du prélèvement (nature, site, latéralité de l'échantillon, numéro, qualité : taille, présence de tumeur et, le cas échéant, discordance entre le type observé et le type attendu) (2, 9, 10) ;
- le contexte clinique (2, 9, 10) ;
- la cellularité tumorale (5, 10) ;
- la présence de facteurs confondants éventuels (nécrose, type cellulaires (cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, ...)) (2-5, 10).

Il convient, par ailleurs, de conclure le résultat de la qualification (9) sur la possibilité de l'utilisation de l'échantillon pour l'analyse en génomique des cancers.

Enfin, les échantillons sont conservés en vue de la réalisation des examens demandés dans la prescription (2, 8, 9).

► Indications

D'après les recommandations de l'INCa (2), les indications principales où la fixation à la paraffine peut être une alternative à la cryopréservation, sont les suivantes :

- tumeurs solides :
 - tumeurs cérébrales ;
 - tumeurs digestives :
 - cancer colorectal ;
 - tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) ;
 - tumeurs de l'estomac ;
 - tumeurs du syndrome de Lynch ;
 - carcinomes pulmonaires ;
 - cancers du sein ;
 - mélanomes.

4.4 Cryopréservation (N006)

Comme indiqué plus haut pour l'acte N005, l'acte N006 (cryopréservation) qui conduit à un compte-rendu avec une qualification de l'échantillon (résultat), peut par analogie être considéré comme un processus d'analyse à trois phases (9, 11). Néanmoins, cet acte n'a pas pour vocation de permettre d'établir un diagnostic, il est dans les faits déclenché par la demande d'un examen de génétique somatique des cancers mais il n'est jamais prescrit directement par le clinicien (9).

4.4.1 Conditions de réalisation

Selon les recommandations françaises et japonaises, la technique de référence pour la réalisation d'analyse de génétique sur les cancers, la cryopréservation est la modalité de conservation qui offre la plus grande qualité et le meilleur rendement d'extraction des acides nucléiques (1, 2, 4).

Pré-analytique

Les conditions de réalisation optimales sont détaillées dans les recommandations de bonne pratique de la Haute Autorité de santé de 2009 (1), les principaux éléments sont brièvement rappelés dans ce travail (cf. Tableau 4).

Les conditions sont différentes en fonction de l'objectif de la conservation (conservation de cellules viables – *pour une mise en culture, par exemple* – ou non – *pour une extraction des acides nucléiques ultérieure*) et type de prélèvement (tissulaire, cellulaire ou liquide biologique).

Tableau 4. Résumé des recommandations de la HAS sur la cryopréservation

	Tissus	Cellules		Liquide Biologique	
	Cellules viables ou extraction d'acide nucléique	Cellules viables	Extraction d'acide nucléique	Cellules viables	Extraction d'acide nucléique
Sélection des échantillons	Par un anatomopathologiste pour les pièces opératoires	Pour les biopsies le préleveur s'assure de la représentativité de l'échantillon destiné au diagnostic anatomopathologique. Pour les tumeurs il est souhaitable de congeler plusieurs échantillons dont un sain.		Fractionnement de l'échantillon	
Lieu de prélèvement	Bloc opératoire	Zone habilitée		Zone habilitée	
Prélèvement et transport	Température ambiante le moins de temps possible (< 30 minutes)	Température ambiante le moins de temps possible		Température ambiante le moins de temps possible. Pour le sang et la moelle sur EDTA, sauf si destiné à la culture, il faut faire le prélèvement sur héparine.	Température ambiante le moins de temps possible. Pour le sang et la moelle sur EDTA, dans les 24 h, à une température de 15 à 25°C.
Conditionnement	Tubes ou sachets adaptés, mis à plat sur un support rigide	Tubes adaptés		Tubes adaptés Nombre de cellules doit être estimé	
Conservation	En dessous de -70°C, pour des conservations long terme à -196°C	En dessous de -70°C, pour des conservations long terme à -196°C. Dans une solution cryoprotectrice.	En dessous de -70°C, pour des conservations long terme à -196°C. En culot sec ou en liquide de lyse, par immersion en azote liquide.	Congélation, lyophilisation	Congélation, lyophilisation. Pour le sang et en préparation d'ADN, il est préférable de congeler un culot de leucocytes.

Comme pour la fixation / inclusion en paraffine, la demande d'examen doit être formalisée dans un bon présentant, outre les gènes à séquencer ou les mutations à rechercher (1, 2, 11), l'identification du patient, la description du prélèvement (nature, site, latéralité de l'échantillon, numéro du prélèvement en cas de train d'échantillons), le contexte clinique, le type de cancer attendu, ainsi que l'horodatage du prélèvement et, le cas échéant, celle de la congélation si elle est réalisée hors du laboratoire (1, 2, 9, 11).

Conformément aux recommandations de la Haute Autorité de santé (1), il est important de bien tracer (minutage) la prise en charge du prélèvement dès l'exérèse de la pièce opératoire ou la réalisation de la biopsie ou du prélèvement.

Les délais d'acheminement vers le lieu de cryopréservation doivent être les plus courts possibles et connus du laboratoire, il est à privilégier une durée avant congélation inférieure à une demi-heure (1, 2).

Dans le cas où un acheminement dans un délai compatible avec une bonne conservation des échantillons serait impossible, l'utilisation de milieux de préservation est une alternative (1, 2).

Analytique

Les recommandations sont uniformes sur l'intérêt de la qualification de l'échantillon destiné à l'analyse moléculaire (1, 2, 10). Dans le cadre d'une exérèse d'organe ou d'une pièce opératoire, la sélection du ou des fragments destinés à la congélation doit être réalisée par un anatomopathologiste en fonction des renseignements communiqués et de l'observation des pièces anatomiques. Dans le cadre d'une biopsie ou d'un prélèvement de petite taille, c'est classiquement au médecin préleveur de donner les indications sur les échantillons destinés à la congélation et ceux qui seront destinés à la qualification anathomopathologique (1, 2).

De la même manière que pour l'acte N005, lors de la réception de l'échantillon congelé ou non, il convient de tracer l'ensemble des étapes en indiquant l'horodatage et en identifiant les personnes effectuant la technique (1, 2, 9-11).

Cette étape dans le cadre de l'acte N006 doit conduire à la qualification de l'échantillon en identifiant les critères suivants :

- la description du prélèvement (nature, site, latéralité de l'échantillon, numéro, qualité : taille, présence de tumeur et, le cas échant, discordance entre le type observé et le type attendu) (1, 2, 9, 10) ;
- le contexte clinique (1, 2, 9, 10) ;
- la cellularité tumorale (1, 5, 10) ;
- la présence de facteurs confondants éventuels (nécrose, type cellulaire (cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, ...) (1-5, 10).

Selon les recommandations françaises de la HAS et de l'INCa, les échantillons (tissus ou cellules) ainsi qualifiés doivent présenter les mêmes caractéristiques que ceux destinés à la congélation (1, 2).

Pour les liquides biologiques, la HAS, dans ses recommandations de 2009, indique que des informations complémentaires peuvent être indiquées, notamment les modalités de recueil et l'éventuelle adjonction d'additifs (anticoagulant, ...). La technique choisie doit être également indiquée et adaptée (culots secs, tampon de lyse, ...) (1).

Post-analytique

Dans les normes et recommandations françaises, il est indiqué qu'il est nécessaire de faire un compte-rendu (y compris interne au laboratoire) indiquant *a minima* :

- l'identification du patient (1, 2, 9, 10) ;

- la description du prélèvement (nature, site, latéralité de l'échantillon, numéro, qualité : taille, présence de tumeur et, le cas échéant, discordance entre le type observé et le type attendu) (1, 2, 9, 10) ;
- le contexte clinique (1, 2, 9, 10) ;
- la cellularité tumorale (1, 5, 10) ;
- la présence de facteurs confondants éventuels (nécrose, type cellulaires (cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, ...)) (1-5, 10).

Selon le guide du Cofrac de 2013 et les recommandations de la HAS de 2009, il convient de conclure le résultat de la qualification (1, 9) sur la possibilité de l'utilisation de l'échantillon pour l'analyse en génomique des cancers.

Enfin, les échantillons sont conservés en vue de la réalisation des examens demandés dans la prescription (1, 2, 8, 9).

4.4.2 Indications

D'après les recommandations de l'INCa (2), les indications, pour lesquelles la cryopréservation ne peut pas être substituée en première intention par la fixation / inclusion, sont :

- tumeurs solides et lymphomes :
 - sarcomes ;
 - lymphomes ;
 - tumeurs pédiatriques ;
- leucémie et autres hémopathies (hors lymphomes) :
 - LAM ;
 - LAL ;
 - LLC ;
 - LMC ;
 - syndrome myéloprolifératif non LMC ;
 - myélome multiple ;
 - syndrome myélodysplasique.

Néanmoins, selon les recommandations de 2015 de la *Japanese Society of Medical Oncology* portant sur la recherche des mutations KRAS et NRAS, les indications d'utilisation de la cryopréservation se réduisent au fur et à mesure de l'implémentation des techniques réalisées sur du matériel fixé et inclus (4).

4.5 Synthèse de l'avis des professionnels

Sur la place de la préparation et sélection de l'échantillon tissulaire, les parties prenantes consultées confirment que :
« *Toute analyse de génétique somatique sur tissu nécessite une sélection et une préparation de l'échantillon tissulaire* ».

4.5.1 Fixation et inclusion en paraffine (N005)

► Conditions de réalisation

Types de tissus concernés

Selon les parties prenantes consultées, l'étape de sélection et préparation de l'échantillon tissulaire **n'est pas spécifique à un tissu en particulier**. Elle peut concerner :

- tous les tissus ;
- certains liquides biologiques, notamment lorsqu'ils comportent des cellules tumorales et qu'il est nécessaire de connaître la proportion de cellules tumorales par rapport à l'ensemble des cellules de l'échantillon (ex : de cytoblocs de liquides péritonéaux) ;
- les échantillons cellulaires obtenus par ponction, aspiration ou frottis.

Modalités de prélèvement recommandées

Selon les parties prenantes consultées, **il n'y a pas de modalité de prélèvement spécifique aux échantillons destinés à l'analyse moléculaire.**

Lorsque les échantillons proviennent de pièces opératoires, ils doivent être prélevés par un pathologiste ou sous sa responsabilité dans le délai le plus court possible après réception au laboratoire de pathologie. Ce délai doit être tracé. Les principes de sélection et de préparation d'échantillons font l'objet de recommandations et de contrôles qualité par des organismes certifiés tels que l'AFAQAP (<https://www.afaqap.fr/>) ou Gen&Tiss (<https://www.iqnpa.org/gentiss/>).

Modalités de préparation recommandées

Selon les parties prenantes consultées, **le fixateur actuellement recommandé est le formol tamponné.** La fixation en liquide de Bouin est à proscrire pour éviter une dégradation trop importante des acides nucléiques.

Le CNPBM a par ailleurs précisé que l'inclusion en paraffine est un standard de tout laboratoire de pathologie. Ce procédé de fixation et inclusion assure la conservation au long cours des tissus et de leur morphologie. Pour éviter la dégradation des acides nucléiques le CNPBM indique que :

- le conditionnement des coupes tissulaires doit se faire dans des contenants adaptés à l'analyse en biologie moléculaire (plastiques *low binding* préférentiellement, stériles et *DNase/RNase free*) ;
- lorsqu'il s'agit de transmission de lames blanches, les coupes sont déposées sur lame de verre et mises à sécher puis conditionnées en boîte de transport pour lames ;
- une identification claire de la zone à prélever sur la lame doit être effectuée : soit par un contournement au dos de la lame elle-même, soit sur une lame colorée par hématoxyline éosine safran (HES) adjacente au prélèvement et qui accompagne l'échantillon ;
- l'évaluation de la cellularité tumorale doit être faite uniquement sur la zone marquée ;
- il n'y a pas d'exigences particulières de température (température ambiante), de transport pour les coupes tissulaires fixées et incluses en paraffine, il n'y a pas de délai d'acheminement à respecter.

Le CNPBM indique qu'une attention toute particulière doit être apportée au moment de la coupe des blocs pour éviter les cross-contaminations entre blocs de tumeurs différentes, coupés de façon successive. Les techniques de biologie moléculaire faisant le plus souvent appel à des techniques d'amplification (PCR), le processus analytique est très sensible.

La nature du fixateur, l'heure de prélèvement de l'échantillon (ainsi que l'heure de fin de la procédure opératoire si l'échantillon provient d'une pièce opératoire), l'heure de fixation doivent être connues.

Procédure de traçabilité à mettre en place

Pour le CNPath, la traçabilité des échantillons est celle en vigueur dans tout laboratoire de pathologie. Les échantillons doivent être accompagnés d'un bon de demande comportant l'identification du patient, celle du prescripteur, celle du préleveur, la nature de l'échantillon, les informations sur le prélèvement, le site de prélèvement. Les échantillons doivent être enregistrés et tracés dans le système de gestion informatique du laboratoire de pathologie, au même titre que tous les échantillons utilisés dans le cadre du diagnostic anatomopathologique

Pour le CNPBM, lors du transfert des échantillons d'un laboratoire de pathologie à un laboratoire de biologie effectuant les analyses moléculaires somatiques, des conventions sont établies pour décrire les exigences requises. Généralement,

- tout échantillon tissulaire transmis doit comporter une identification dactylographiée de l'échantillon comportant nom, prénom et n° d'histologie et lorsque cela est possible, la date de naissance du patient (exigences biologie médicale) ;
- l'échantillon doit être accompagné d'une prescription répondant aux exigences de la biologie médicale, ainsi que du compte-rendu de pathologie correspondant à l'échantillon. L'ensemble de ces documents permet d'assurer l'identitovigilance indispensable et permet de vérifier la correspondance entre nom/prénom/DDN – n° histologie-contexte tumoral du CR anatomopathologique.

En cas d'incohérence dans ces informations, l'échantillon doit faire l'objet d'une non-conformité, qui peut être critique et conduire au refus de l'échantillon si un doute d'identité ne peut être levé.

Description du rendu des résultats

Pour le CNPBM, **l'acte N005 ne génère pas un résultat en soi**. C'est une étape pré-analytique indispensable à toute analyse de génétique somatique qui **garantit la représentativité de la zone tumorale qui sera analysée** :

- en termes de pourcentage de cellules tumorales / nombre total de cellules de l'échantillon, permettant le choix de la méthode d'analyse moléculaire adaptée à la sensibilité requise et à l'interprétation correcte du résultat moléculaire ;
- en termes de zone tumorale d'intérêt à analyser. En effet, les tumeurs étant hétérogènes, il est important qu'un professionnel compétent sélectionne la zone pertinente qui assurera un résultat biologique ayant un sens.

Pour le CNPath, le rendu des résultats doit se faire sous la forme d'un compte-rendu structuré indiquant :

- les identifiants du patient ;
- la nature et le site de l'échantillon, ses identifiants ;
- le contexte clinique ;
- les éléments décrivant la qualité de l'échantillon : taille (grand diamètre ou surface de la section examinée) ;
- présence de tumeur (et éventuellement, discordance du type tumoral observé avec le type tumoral attendu selon les données cliniques transmises) ;
- cellularité tumorale (estimée, selon les recommandations, comme un pourcentage du nombre total de cellules) ;
- les facteurs confondants éventuels (nécrose, éventuellement évaluée en surface de la section examinée, cellules « normales » éventuellement présentes, cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose et tout autre facteur d'intérêt).

Destinataires des résultats

Pour le CNPath, les résultats sont à communiquer au responsable de l'analyse moléculaire demandé et à inclure dans le dossier médical du patient. Le CNPBM rappelle que l'acte N005 ne génère pas un résultat en soi, mais que la cellularité tumorale est à indiquer dans le compte-rendu de génétique somatique, de même que le recours à une macrodissection, le cas échéant. De plus, le CNPBM rappelle que même en cas de cellularité tumorale basse, l'analyse moléculaire est généralement réalisée du fait de la sensibilité des techniques actuelles. Ainsi, une faible cellularité va conduire à considérer que les résultats ne sont pas interprétables, plutôt qu'à conclure en l'absence de détection de mutations d'intérêt.

► Indications

Selon les deux CNP consultés, **il est impossible de décrire l'ensemble des situations rencontrées en génétique somatique des cancers, les indications évoluant très rapidement.** La fixation / inclusion des tissus est un principe de base du conditionnement tissulaire, qu'il soit dans un but d'analyse en pathologie ou d'analyse moléculaire. Les techniques d'analyse moléculaires se sont adaptées et développées sur la base des échantillons tissulaires les plus largement disponibles qui sont les tissus fixés et inclus en paraffine. Il est maintenant possible de faire des analyses haut débit sur ADN comme sur ARN issus de tissus fixés, ce qui n'était pas possible ou peu performant il y a encore quelques années.

Actuellement, les indications qui seraient incontournables selon le CNPath, sont :

- cancer du côlon ;
- cancer du poumon ;
- mélanomes ;
- sarcomes dont GIST ;
- tumeurs pédiatriques ;
- tumeurs cérébrales ;
- certaines tumeurs rares à anomalies moléculaires à valeur diagnostique, lymphomes, ... ;
- des indications émergentes concernant d'autres cancers fréquents, comme le cancer du sein ;
- enfin, certaines indications sont agnostiques (BRCA, TRK, par exemple).

► Avantages et inconvénients par rapport à la cryopréservation

Dans le tableau ci-dessous, voici les avantages et inconvénients relevés par les différents CNP.

Tableau 5. Avantages et inconvénients de la fixation / inclusion vis-à-vis de la cryopréservation pour les parties prenantes

	Avantages	Inconvénients
CNPath	Disponibilité des échantillons ; reproductibilité du processus ; facilité de manipulation et de transport ; adaptation possible des techniques moléculaires.	Difficultés d'implémentation pour certaines techniques ; risque de perte de sensibilité.
CNPBM	Disponibilité des échantillons ; facilité de manipulation et de transport.	Dégradation / altération des acides nucléiques pouvant créer des artéfacts et de faux positifs ; taux d'échecs analytiques pouvant approcher les 10-15 % pour certaines analyses ; difficultés d'implémentation pour certaines techniques.

4.5.2 Cryopréservation (N006)

► Conditions de réalisation

Types de tissus concernés

Le CNPath indique que tous **les tissus peuvent faire l'objet d'une cryopréservation**, lorsqu'elle est justifiée par la demande d'examen. Par ailleurs, le CNPath rappelle que, conformément aux recommandations, tout échantillon tissulaire doit faire l'objet d'une sélection et d'un contrôle histologique avant l'analyse moléculaire. Le CNPBM indique également que c'est l'analyse demandée qui justifie du tissu à cryopréserver, mais que tous les tissus peuvent être congelés. Parmi les

techniques justifiant l'usage de tissus cryopréservés, le CNPBM indique les analyses en *single cell* ou les analyses pan génomique.

Modalités de prélèvement recommandées

Selon les parties prenantes consultées, **il n'y a pas de modalité de prélèvement spécifique aux échantillons destinés à l'analyse moléculaire.**

Lorsque les échantillons proviennent de pièces opératoires, ils doivent être prélevés par un pathologiste ou sous sa responsabilité dans le délai le plus court possible après réception au laboratoire de pathologie. Ce délai doit être tracé et le plus réduit possible. Les principales recommandations sont celles de l'INCa (2) et de la HAS (1).

Modalités de préparation recommandées

Le CNPath indique que les techniques doivent être décrites, le délai entre le prélèvement et la cryopréservation doit être tracé et inférieur à 30 minutes idéalement, le CNPBM précise que pour les prélèvements tissulaires il est souhaitable que le fragment soit mis à plat et orienté sur un support rigide (type lamelle de verre stérile) qui sera introduit dans le tube de congélation. La rapidité de traitement après prélèvement est également mise en avant par le CNPBM qui identifie les différentes techniques de congélation (azote liquide, vapeurs d'azote liquide, congélateur garantissant le maintien d'une température inférieure à -70°C).

Procédure de traçabilité à mettre en place

Pour le CNPath, la traçabilité des échantillons est celle en vigueur dans tout laboratoire de pathologie. Les échantillons doivent être accompagnés d'un bon de demande comportant l'identification du patient, celle du prescripteur, celle du préleveur, la nature de l'échantillon, les informations sur le prélèvement, le site de prélèvement. Les échantillons doivent être enregistrés et tracés dans le système de gestion informatique du laboratoire de pathologie au même titre que tous les échantillons utilisés dans le cadre du diagnostic anatomopathologique.

Pour le CNPBM, l'identification du prélèvement doit être faite sur le cryotube en veillant à la lisibilité permanente de l'identité avec numéro d'enregistrement en pathologie et, si possible, les premières initiales du nom et prénom (caractères de taille suffisante, majuscules, encre noire permanente, crayons et/ou étiquettes cryogéniques).

Description du rendu des résultats

Pour le CNPBM, **l'acte N006 ne génère pas un résultat en soi.** C'est une étape pré-analytique indispensable à toute analyse de génétique somatique qui **garantit la représentativité de la zone tumorale qui sera analysée :**

- en termes de pourcentage de cellules tumorales / nombre total de cellules de l'échantillon, permettant le choix de la méthode d'analyse moléculaire adaptée à la sensibilité requise et à l'interprétation correcte du résultat moléculaire ;
- en termes de zone tumorale d'intérêt à analyser. En effet, les tumeurs étant hétérogènes, il est important qu'un professionnel compétent sélectionne la zone pertinente qui assurera un résultat biologique ayant un sens.

Pour le CNPath, le rendu des résultats doit se faire sous la forme d'un compte-rendu structuré indiquant :

- les identifiants du patient ;
- la nature et le site de l'échantillon, ses identifiants ;
- le contexte clinique ;
- les éléments décrivant la qualité de l'échantillon : taille (grand diamètre ou surface de la section examinée) ;

- présence de tumeur (et éventuellement, discordance du type tumoral observé avec le type tumoral attendu selon les données cliniques transmises) ;
- cellularité tumorale (estimée, selon les recommandations, comme un pourcentage du nombre total de cellules) ;
- les facteurs confondants éventuels (nécrose, éventuellement évaluée en surface de la section examinée, cellules « normales » éventuellement présentes, cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose et tout autre facteur d'intérêt).

Le CNPath insiste sur le fait que le contrôle histologique est souvent plus difficile à réaliser à partir d'une coupe de tissu cryopréservé que d'une coupe de tissu fixé et inclus en paraffine, mais n'en demeure pas moins nécessaire.

Destinataires des résultats

Pour le CNPath, les résultats sont à communiquer au responsable de l'analyse moléculaire demandée et sont inclus dans le dossier médical du patient.

Le CNPBM rappelle que l'acte N006 ne génère pas un résultat en soi, mais que la cellularité tumorale est à indiquer dans le compte-rendu de génétique somatique, de même que le recours à une macrodissection, le cas échéant. De plus, le CNPBM rappelle que même en cas de cellularité tumorale basse l'analyse moléculaire est généralement réalisée, ce qui est rendu possible par la sensibilité des techniques actuelles. Ainsi, une faible cellularité va conduire à considérer que les résultats ne sont pas interprétables, plutôt qu'à conclure en l'absence de détection de mutations d'intérêt.

Cependant, la cellularité tumorale est indiquée dans le CR de génétique somatique, ainsi que le recours à une macrodissection, si cela a été le cas.

► Indications

Le CNPath rappelle que **les indications ont été fixées par l'INCa** en 2011 (2) et restent d'actualité. D'une façon générale, cette approche peut être recommandée pour les tumeurs solides survenant chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte de moins de 40 ans.

Le CNPBM précise que le recours aux prélèvements cryopréservés en routine se restreint à des cas particuliers :

- échecs sur tissus fixés ;
- analyses haut débit nécessitant des acides nucléiques d'excellente qualité (exomes, transcritomes) ;
- tests fonctionnels.

► Avantages et inconvénients par rapport à la fixation / inclusion

Dans le tableau ci-dessous, voici les avantages et inconvénients relevés par les différents CNP.

Tableau 6. Avantages et inconvénients de la cryopréservation vis-à-vis de la fixation / inclusion pour les parties prenantes

	Avantage	Inconvénients
CNPath	• Analyses moléculaires plus exhaustives (WGS, WES, méthylation) ; • plus grande sensibilité.	Limitation des sites de prélèvement ; manipulation et transport ; difficultés spécifiques du contrôle histologique de la qualité de l'échantillon.
CNPBM	• Acides nucléiques (ADN et ARN) d'excellente qualité ; • analyses sur cellules viables.	Limitation des sites de prélèvement ; coût du processus.

Conclusion et perspectives

En tenant compte des données de la littérature et de la position des professionnels de santé, la HAS conclut :

Toute analyse de génétique somatique sur tissus, cellules ou liquides biologiques nécessite une préparation, une qualification et une sélection des échantillons.

Sur les conditions de préparation, de qualification et de sélection des échantillons, il ressort les éléments suivants :

► Sélection et préparation d'un échantillon tissulaire ou cellulaire fixé et inclus en paraffine pour l'analyse de génétique somatique des cancers (code N005)

Conditions de réalisation

- Il convient que les protocoles soient clairement établis et formalisés lors de la contractualisation entre le service demandeur / préleveur et le laboratoire ;
- Les pièces tissulaires doivent être impérativement immergées dans un volume suffisant de fixateur dès le prélèvement ;
- Le fixateur uniformément préconisé est le formol tamponné à 10 % (les fixateurs acides (liquide de Bouin, AFA, ...) induisant la dégradation des acides nucléiques) ;
- Le temps de réalisation de la fixation et les délais d'acheminement vers le laboratoire doivent être conformes aux protocoles validés ;
- La déshydratation des échantillons doit être réalisée par des bains de concentrations croissantes d'alcool puis par un solvant Toluène ou Xylène avant inclusion dans la paraffine ;
- L'inclusion doit être réalisée dans la paraffine, les autres matériaux d'inclusion (celloïdine, résines plastiques, ...) sont exclus ;
- Après durcissement, le bloc est utilisé et conservé pour la qualification et pour les techniques de génétique somatique des cancers.

Qualification et sélection

La qualification permet :

- de décrire le prélèvement (nature, observation macroscopique : taille, présence de tumeur et le cas échéant, la discordance entre le type observé et le type attendu) ;
- de déterminer la cellularité tumorale ;
- d'identifier la présence d'éventuels facteurs confondants (nécrose, type cellulaire, cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, ...).

À l'issue de la qualification, est réalisée ou validée la sélection des échantillons destinés à l'analyse génétique somatique des cancers.

Compte-rendu

Le compte-rendu est nécessaire ; il contient en sus des éléments décrits ci-dessus, l'identification du patient et les éléments du contexte clinique. Ce compte-rendu est destiné au laboratoire réalisant les examens de génétique somatique des cancers et doit être conservé dans le dossier patient.

Indications

Conformément aux recommandations de l'INCa de 2011¹, la fixation / inclusion peut être réalisée dans les cas suivants :

- tumeurs solides :
 - tumeurs cérébrales ;
 - tumeurs digestives :
 - cancer colorectal ;
 - tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) ;
 - tumeurs de l'estomac ;
 - tumeurs du syndrome de Lynch ;
 - carcinomes pulmonaires ;
 - cancers du sein ;
 - mélanomes.

En l'absence d'alternative de préparation, les autres tumeurs solides et lymphomes peuvent être fixés et inclus avant la réalisation d'examens de génétique.

► Sélection et préparation d'un échantillon tissulaire ou cellulaire congelé pour l'analyse de génétique somatique des cancers (N006)

Conditions de réalisation

Les conditions de réalisation optimales ont déjà été décrites dans les recommandations de bonne pratique de la Haute Autorité de santé de 2009².

Qualification et sélection

La qualification permet de déterminer :

- la description du prélèvement (nature, observation macroscopique : taille, présence de tumeur et le cas échéant, la discordance entre le type observé et le type attendu) ;
- de déterminer la cellularité tumorale ;
- d'identifier la présence d'éventuels facteurs confondants (nécrose, type cellulaires, cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, ...) ;
- les échantillons (tissus ou cellules) ainsi qualifiés doivent présenter les mêmes caractéristiques que ceux destinés à la congélation ;
- pour les liquides biologiques, des informations complémentaires sont indiquées, notamment les modalités de recueil et l'éventuelle adjonction d'additifs (anticoagulant, ...). La technique choisie doit être également indiquée et adaptée (culots secs, tampon de lyse, ...).

À l'issue de la qualification, est réalisée ou validée la sélection des échantillons destinés à l'analyse génétique somatique des cancers.

Compte-rendu

Le compte-rendu est nécessaire ; il contient en sus des éléments décrits ci-dessus, l'identification du patient et les éléments du contexte clinique. Ce compte-rendu est destiné au laboratoire réalisant les examens de génétique somatique des cancers et doit être conservé dans le dossier patient.

Indications

La cryopréservation peut être réalisée dans l'ensemble des situations de recherche d'altération génétique, mais il n'est actuellement pas recommandé de substituer la cryopréservation par la fixation / inclusion dans les cas suivants :

- tumeurs solides et lymphomes :
 - sarcomes ;
 - lymphomes ;
 - tumeurs pédiatriques ;
- leucémie et autres hémopathies (hors lymphomes) :
 - LAM ;
 - LAL ;
 - LLC ;
 - LMC ;
 - syndrome myéloprolifératif non LMC ;
 - myélome multiple ;
 - syndrome myélodysplasique.

À noter que toutes les données analysées ne permettent pas de positionner un acte par rapport à l'autre ou vis-à-vis d'autres actes de préparation, qualification et sélection des échantillons.

Au regard de ces éléments, la HAS considère que les actes de préparation, de qualification et de sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomocytopathologie (soit la fixation et l'inclusion en paraffine ou N005, soit la cryoconservation ou N006) sont nécessaires à la bonne analyse de ces échantillons en génétique somatique des cancers.

Annexe 1. Recherche documentaire

Bases de données bibliographiques automatisées

- Medline (National Library of Medicine, États-Unis) ;
- Embase (Elsevier) ;
- The Cochrane Library (Wiley Interscience, États-Unis) ;
- Science Direct (Elsevier).

Tableau 7. Stratégie de recherche documentaire

Type d'étude / sujet / Termes utilisés		Période de recherche	Nombre de références
Préparation et de qualification d'un échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomocytopathologie pour l'analyse en génétique somatique des cancers Inclusion en paraffine			
Étape 1	"Paraffin Embedding/standards"[Majr] OR "Paraffin Embedding"[Mesh] OR Paraffin-embedded Tissue Field: Title/abstract AND consensus or guideline* or recommendation* or standard* Field: Title	01/2008-06/2019	31
Préparation et de qualification d'un échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomocytopathologie pour l'analyse en génétique somatique des cancers Cryoconservation			
Étape 2	"Cryopreservation/standards"[Majr] OR ("Cryopreservation"[Mesh] AND "Cells"[Mesh]) OR Frozen Tissue Or frozen cells Field: Title/abstract AND Consensus or guideline* or recommendation* or standard* Field: Title	01/2008-06/2019	54

Une veille bibliographique a été maintenue sur le sujet jusqu'en octobre 2019.

Les sites Internet internationaux des sociétés pertinentes cités ci-dessous ont été explorés en complément des sources interrogées systématiquement :

Adelaide Health Technology Assessment

Agencia de Evaluación de Tecnología e Investigación Médicas de Cataluña

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Galicia

Agency for Healthcare Research and Quality

Alberta Heritage Foundation for Medical Research

Association française d'assurance qualité en anatomie pathologique,

American Medical Association

Blue Cross Blue Shield Association - Technology Evaluation Center

Bibliothèque médicale Lemanissier

Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health

Centers for Disease Control and Prevention

California Technology Assessment Forum

Centre fédéral d'expertise des soins de santé
CISMeF
CMAInfobase
Canadian Association of Pathologists
College of American Pathologists,
Cofrac
Cochrane Library Database
Centre for Review and Dissemination databases
Department of Health (UK)
ECRI Institute
Euroscan
European Society of Pathology
GIN (Guidelines International Network)
Haute Autorité de santé
Horizon Scanning
Institut national du cancer,
Institute for Clinical Systems Improvement
Institut National d'Excellence en Santé et en Services Sociaux
Institut national de veille sanitaire
Instituto de Salud Carlos III / Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias
Iowa Healthcare collaborative
National Coordinating Centre for Health Technology Assessment
National Horizon Scanning Centre
National Health and Medical Research Council
National Health committee
National Institute for Health and Clinical Excellence
National Institutes of Health
New Zealand Guidelines Group
Réseaux d'histologie expérimentale
Royal College of Pathologists
Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias OSTEBA
Société francophone de greffe de moelle osseuse et de thérapie cellulaire
Ontario Health Technology Advisory Committee
Scottish Intercollegiate Guidelines Network
Singapore Ministry of Health
West Midlands Health Technology Assessment Collaboration
World Health Organization.

Annexe 2. Listes des tableaux, graphiques

Tableau 1. Libellé et valorisation des actes N005 et N006	11
Tableau 2. Présentation des critères de sélection	14
Tableau 3. Liste des organismes interrogés par champ disciplinaire	17
Tableau 4. Résumé des recommandation de la HAS sur la cryopréservation.....	23
Tableau 5. Avantages et inconvénients de la fixation / inclusion vis-à-vis de la cryopréservation pour les parties prenantes	28
Tableau 6. Avantages et inconvénients de la cryopréservation vis-à-vis de la fixation / inclusion pour les parties prenantes	30
Tableau 7. Stratégie de recherche documentaire	34

Annexe 3. Grille AGREE II

		ITEM
Champ & objectifs	1	Le ou les objectifs de la RPC sont décrits explicitement
	2	La ou les questions de santé couvertes par la RPC sont décrites explicitement
	3	La population à laquelle la RPC doit s'appliquer est décrite explicitement
		score (%)
Participation des groupes concernés	4	Le groupe ayant élaboré la RPC inclut des représentants de tous les groupes professionnels concernés
	5	Les opinions et les préférences de la population cible ont été identifiées
	6	Les utilisateurs cibles de la RPC sont clairement définis
		score (%)
Rigueur d'élaboration	7	Des méthodes systématiques ont été utilisées pour rechercher des preuves scientifiques
	8	Les critères de sélection des preuves sont clairement décrits
	9	Les forces et les limites des preuves scientifiques sont clairement définies
	10	Les méthodes utilisées pour formuler les recommandations sont clairement décrites
	11	Les bénéfices, les effets secondaires et les risques en termes de santé ont été pris en considération dans la formulation des recommandations
	12	Il y a un lien explicite entre les recommandations et les preuves scientifiques sur lesquelles elles reposent
	13	La RPC a été revue par des experts externes avant sa publication
	14	Une procédure d'actualisation de la RPC est décrite
		score (%)
Clarté & présentation	15	Les recommandations sont précises et sans ambiguïté
	16	Les différentes options de prise en charge de l'état ou du problème de santé sont clairement présentées
	17	Les recommandations clés sont facilement identifiables
		score (%)
Applicabilité	18	La RPC décrit les éléments facilitant son application et les obstacles
	19	La RPC offre des conseils et/ou des outils sur les façons de mettre les recommandations en pratique
	20	Les répercussions potentielles de l'application des recommandations sur les ressources ont été examinées
	21	La RPC propose des critères de suivi et/ou de vérification
		score (%)
Indépendance éditoriale	22	Le point de vue des organismes de financement n'ont pas influencé le contenu de la RPC
	23	Les intérêts divergents des membres du groupe ayant élaboré la RPC ont été pris en charge et documentés
		score (%)
Évaluation générale		Qualité générale de la recommandation
		Recommandation de l'utilisation

Annexe 4. Tableau d'analyse critique avec la grille AGREE II des recommandations de bonne pratique identifiées

ITEMS Score Recommandations	Champ & objectifs	Participation des groupes concernés	Rigueur d'élaboration	Clarté & présentation	Applicabilité	Indépendance éditoriale	Évaluation générale : qualité générale de la recommandation
<i>Guidelines for cytogenetic investigations in tumours Hastings et al. (3)</i>	72,2 %	72,2 %	8,3 %	33,3 %	16,7 %	50,0 %	Recommandation de bonne qualité méthodologique
<i>Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: RAS (KRAS/NRAS) mutation testing in colorectal cancer patients Japanese Society of Medical Oncology (4)</i>	94,4 %	66,7 %	8,3 %	55,6 %	25,0 %	33,3 %	Recommandation de bonne qualité méthodologique
<i>Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie INCa (2)</i>	100,0 %	72,2 %	52,1 %	88,9 %	41,7 %	41,7 %	Recommandation de très bonne qualité méthodologique
<i>Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin HAS (1)</i>	100,0 %	72,2 %	62,5 %	55,6 %	33,3 %	41,7 %	Recommandation de très bonne qualité méthodologique
<i>Pre-Microscopic Examination Specimen Handling Guidelines in the Surgical Pathologie Laboratory CAP / NSH (6)</i>	100,0 %	66,7 %	37,5 %	94,4 %	66,7 %	41,7 %	Recommandation de très bonne qualité méthodologique
<i>Uniform Labeling of Blocks and Slides in Surgical Pathology CAP / NSH (7)</i>	94,4 %	66,7 %	54,2 %	66,7 %	58,3 %	41,7 %	Recommandation de très bonne qualité méthodologique

ITEMS Score Recommandations	Champ & objectifs	Participation des groupes concernés	Rigueur d'élaboration	Clarté & présentation	Applicabilité	Indépendance éditoriale	Évaluation générale : qualité générale de la recommandation
<i>Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients Cree I A et al (5)</i>	77,8 %	61,1 %	4,2 %	22,2 %	33,3 %	41,7 %	Recommandation de bonne qualité méthodologique
<i>The retention and storage of pathological records and specimens The Royal College of Pathologists (8)</i>	94,4 %	66,7 %	10,4 %	44,4 %	45,8 %	41,7 %	Recommandation de très bonne qualité méthodologique

Annexe 5. Réponse du Conseil National Professionnel des Pathologistes (CNPath) sur l'évaluation de l'acte N005

METHODE

Pour quels tissus et liquides biologiques, la sélection et la préparation d'un échantillon tissulaire fixé et inclus en paraffine pour une analyse en génétique somatique des cancers, vous paraissent-elles pertinentes ?

Réponse :

M1

La question ne se pose évidemment que pour les tissus, pas pour les liquides biologiques. Il faut cependant souligner que, en plus des échantillons tissulaires, des échantillons cellulaires obtenus par ponction, aspiration ou frottis peuvent également être utilisés pour des analyses moléculaires après fixation. La fixation en paraffine, sous réserve du respect des recommandations de bonnes pratiques pour la préparation pré-analytique, permet actuellement de réaliser la plupart des techniques d'analyses utiles en génétique somatique des cancers dans le cadre du diagnostic. Les recommandations nationales et internationales insistent sur le fait que tout échantillon tissulaire doit faire l'objet d'une sélection et d'un contrôle histologique avant l'analyse moléculaire.

Quels éléments avez-vous mis en place pour assurer une traçabilité optimale des échantillons ?

Réponse :

M2

Les échantillons doivent être accompagnés d'un bon de demande comportant l'identification du patient, celle du prescripteur, celle du préleveur, la nature de l'échantillon, les informations sur le prélèvement, le site de prélèvement. Les échantillons doivent être enregistrés et tracés dans le système de gestion informatique du laboratoire de pathologie au même titre que tous les échantillons utilisés dans le cadre du diagnostic anatomopathologique.

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de prélèvement que vous recommandez ?

Réponse :

M3

Il n'y a pas de modalité de prélèvement spécifique aux échantillons destinés à l'analyse moléculaire. Lorsque les échantillons proviennent de pièces opératoires, ils doivent être prélevés par un pathologiste ou sous sa responsabilité dans le délai le plus court possible après réception au laboratoire de pathologie. Ce délai doit être tracé.

Quels éléments cliniques sont demandés ou attendus ?

Réponse :

M4

Le bon de demande doit comporter le type de tumeur attendu, la nature des examens moléculaires demandés, le contexte clinique justifiant la demande d'analyse moléculaire (évaluation initiale, résistance au traitement, rechute, métastase ...)

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de préparation, de transport et de conservation ou tout commentaire qui vous semblerait pertinent concernant la phase pré-analytique (nature de la fixation, délais acceptés, ...) :

M5

Réponse :

Le fixateur actuellement recommandé est le formol tamponné. La nature du fixateur, l'heure de prélèvement de l'échantillon (ainsi que l'heure de fin de la procédure opératoire si l'échantillon provient d'une pièce opératoire), l'heure de fixation doivent être connues.

RESULTATS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de rendu des résultats (dans le cadre de l'acte N005, à savoir la cellularité, la qualification du prélèvement, ...) :

R1

Réponse :

Le rendu des résultats doit se faire sous la forme d'un compte rendu structuré indiquant les identifiants du patient, la nature et le site de l'échantillon, ses identifiants, le contexte clinique, ainsi que les éléments décrivant la qualité de l'échantillon : taille (grand diamètre ou surface de la section examinée), présence de tumeur (et éventuellement, discordance du type tumoral observé avec le type tumoral attendu selon les données cliniques transmises), cellularité tumorale (estimée selon les recommandations, comme un pourcentage du nombre total de cellules), les facteurs confondants éventuels (nécrose, éventuellement évaluée en surface de la section examinée, cellules « normales » éventuellement présentes, cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, et tout autre facteur d'intérêt)

A qui sont communiqués les résultats (patient, ...) ?

R2

Réponse :

Les résultats sont communiqués au responsable de l'analyse moléculaire en aval et inclus dans le dossier médical du patient.

Parmi les éléments cliniques demandés à la question M4, lesquelles sont nécessaires à la bonne interprétation du résultat ?

R3

Réponse :

Contexte clinique, type de tumeur attendu.

INDICATION, PLACE DE L'INCLUSION EN PARAFFINE DANS LA GENETIQUE SOMATIQUE DES CANCERS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les indications retenues (type oncologique tissulaire ou d'organe – sarcome, cancer du côlon, etc. ... –, taille, localisation, âge du patient, ...) :

Réponse :

I1

Il est difficile de répondre de façon exhaustive à cette question, les indications évoluant très rapidement. Actuellement, les indications incontournables sont : cancer du côlon, cancer du poumon, mélanomes, sarcomes dont GIST, tumeurs pédiatriques, tumeurs cérébrales, certaines tumeurs rares à anomalies moléculaires à valeur diagnostique, lymphomes ... Des indications émergentes concernent d'autres cancers fréquents, comme le cancer du sein. Enfin, certaines indications sont agnostiques (BRCA, TRK, par exemple).

Quels sont les avantages de l'inclusion en paraffine dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de la cryoconservation) ?

I2

Réponse :

Disponibilité dans tous les sites de prélèvement, reproductibilité du processus, facilité de manipulation et de transport, adaptation possible des techniques moléculaires.

Quels sont les inconvénients de l'inclusion en paraffine dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de la cryoconservation) ?

I3

Réponse :

Certaines techniques moléculaires, mais habituellement du cadre des techniques actuellement utiles en diagnostic, restent difficiles à implémenter. Risque de perte de sensibilité par rapport à la cryoconservation.

DIVERS

Cet acte est-il accréditable ? Si oui, sous quelle portée ?

D1

Réponse :

L'acte est un acte d'anatomie pathologique et donc, en tant que tel, ne relève pas d'une accréditation obligatoire. Il est accréditable sur la base d'une démarche volontaire. Domaine : Anatomie et Cytologie pathologiques – Sous-famille : Histologie (HISTOACP).

Quels sont les contrôles qualité mis en œuvre (internes et externes) ?

D2

Réponse :

Il est recommandé de répondre aux contrôles qualité externes proposés par l'AFAQAP et Gen&Tiss. Des contrôles internes (contrôle de la cellularité, concordance avec les résultats moléculaires) sont souhaitables.

Quelles sont les difficultés de mise en œuvre de la conservation et du transport ? Est-ce un facteur réduisant la qualité des acides nucléiques extraits ? Quelles mesures conservatoires seraient souhaitables ?

Réponse :

D3

Pas de difficulté spécifique par rapport aux autres échantillons fixés et inclus en paraffine (respect des bonnes pratiques de conservation établies par la spécialité). La qualité des acides nucléiques peut être altérée par une conservation dans des conditions inappropriées. Il est conseillé de conserver les lames de contrôle histologique, sous forme physique ou sous forme numérique, pendant une durée appropriée à la réalisation des analyses moléculaires et au suivi du patient.

Annexe 6. Réponse du Conseil National Professionnel de Biologie Médicale sur l'évaluation de l'acte N005

METHODE

Pour quels tissus et liquides biologiques, la sélection et la préparation d'un échantillon tissulaire fixé et inclus en paraffine pour une analyse en génétique somatique des cancers, vous paraissent-elles pertinentes ?

Réponse :

M1

Toute analyse de génétique somatique sur tissu nécessite une sélection et une préparation de l'échantillon tissulaire : sélection du bloc tumoral le plus représentatif ou de la zone du bloc la plus riche en cellules tumorales, coupes tissulaires des zones d'intérêt identifiées et évaluation du pourcentage de cellules tumorales sur le nombre total de cellules nucléées de l'échantillon. Cette étape n'est donc pas spécifique à un tissu en particulier. De nombreux articles rapportent les exigences de ces étapes pré-analytiques cruciales pour une analyse moléculaire adéquate.

J Clin Pathol. 2014 Nov; 67(11): 923–931.

Certains liquides biologiques peuvent nécessiter une étape de sélection et de préparation notamment lorsqu'ils comportent des cellules tumorales. Dans ce cas, il peut être également nécessaire de connaître la proportion de cellules tumorales par rapport à l'ensemble des cellules de l'échantillon. C'est le cas de cytoblocs de liquides péritonéaux par exemple. Dans ce cas, des coupes sont également préparées.

Quels éléments avez-vous mis en place pour assurer une traçabilité optimale des échantillons ?

Réponse :

M2

La traçabilité des échantillons est celle en vigueur dans tout laboratoire de pathologie.

Lors du transfert des échantillons d'un laboratoire de pathologie à un laboratoire de biologie effectuant les analyses moléculaires somatiques, des conventions sont établies pour décrire les exigences requises. Généralement, tout échantillon tissulaire transmis doit comporter une identification dactylographiée de l'échantillon comportant nom, prénom et n° d'histologie et lorsque cela est possible la date de naissance du patient (exigences biologie médicale). Ces exigences sont aisées à respecter lorsqu'il s'agit de transmissions de coupes tissulaires conditionnées en tubes unitaires stériles de type Eppendorf. Cela peut être plus complexe lorsque des lames blanches sont transmises du fait des contraintes d'annotations de lames qui dépend du système informatique et de marquage du laboratoire de pathologie. Dans ce cas, a minima, le n° de pathologie de l'échantillon doit être indiqué de façon univoque.

L'échantillon doit être accompagné d'une prescription répondant aux exigences de la biologie médicale ainsi que du compte rendu de pathologie correspondant à l'échantillon. L'ensemble de ces documents permet d'assurer l'identitovigilance indispensable et permet de vérifier la correspondance entre nom / prénom / DDN – n° histologie-contexte tumoral du CR anatomopathologique.

En cas d'incohérence dans ces informations, l'échantillon doit faire l'objet d'une non-conformité, qui peut être critique et conduire au refus de l'échantillon si un doute d'identité ne peut être levé. Compte tenu de la préciosité de l'échantillon et de son caractère unique, l'ensemble du processus doit être réalisé avec une vigilance extrême.

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de prélèvement que vous recommandez ?

Réponse :

M3

C'est un processus global qui s'applique à tous les tissus tumoraux fixés et inclus en paraffine selon les spécificités de chaque organe et qui relève de la compétence du pathologiste.

Les principes de sélection et de préparation d'échantillons font l'objet de recommandations et de contrôles qualité par des organismes certifiés tels que l'AFAQAP (<https://www.afaqap.fr/>) ou Gen&Tiss (<https://www.iqnpa.org/gentiss/>).

Il serait fastidieux de les décrire tous.

Quels éléments cliniques sont demandés ou attendus ?

Réponse :

M4

Dans le but de réaliser une analyse dans les conditions de juste prescription et permettre une interprétation circonstanciée des génotypes mis en évidence, il est indispensable de connaître le contexte clinique de la demande, certains paramètres pathologiques (dépendants de l'organe considéré) et la raison de cette prescription (recherche de biomarqueurs diagnostiques, théranostiques, pronostiques, recherche de mécanismes de résistance à une thérapeutique... etc.). Ces éléments relèvent du clinicien mais également du pathologiste et nécessitent donc la mise en place de feuilles de prescription, qui accompagnent l'échantillon tout au long du processus.

Il est à noter que certains biomarqueurs diagnostiques sont demandés directement par le pathologiste pour rentrer dans sa démarche diagnostique histo-moléculaire, dans ce cas le résultat est rendu uniquement au pathologiste qui synthétise les données et pose son diagnostic, qui sera ensuite transmis au clinicien.

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de préparation, de transport et de conservation ou tout commentaire qui vous semblerait pertinent concernant la phase pré-analytique (nature de la fixation, délais acceptés, ...) :

Réponse :

M5

Le fixateur largement recommandé et répandu est le formol tamponné. La fixation en liquide de Bouin est à proscrire pour éviter une dégradation trop importante des acides nucléiques, mais cela ne concernerait que de très anciens blocs, ce mode de fixation ayant été largement abandonné. L'inclusion en paraffine est un standard de tout laboratoire de pathologie.

Le procédé de fixation et inclusion assure la conservation au long cours des tissus et de leur morphologie, qui correspond aux besoins de la pratique de l'anatomie pathologique. En revanche, c'est un traitement qui dégrade les acides nucléiques et peut compromettre les analyses de biologie moléculaire. Bien que la plupart des analyses aient été adaptées à cette qualité de matériel, des échecs de technique sont régulièrement observés. Il peut être nécessaire de recourir à un autre bloc du prélèvement voire un prélèvement tumoral d'autre moment de la maladie, lorsqu'une analyse moléculaire n'est pas interprétable sur l'échantillon initial adressé.

Le conditionnement des coupes tissulaires doit se faire dans des contenants adaptés à l'analyse en biologie moléculaire (plastiques *low binding* préférentiellement, stériles et DNase/RNase free). Lorsqu'il s'agit de transmissions de lames blanches, les coupes sont déposées sur lame de verre et mis à sécher puis conditionnées en boîte de transport pour lames. Dans ce cas, une identification claire de la zone à prélever sur la lame doit être effectuée : soit par un contournement au dos de la lame elle-même soit sur une lame

colorée HES adjacente au prélèvement et qui accompagne l'échantillon. L'évaluation de la cellularité tumorale doit être faite uniquement sur la zone marquée.

Il n'y a pas d'exigence particulière de température (température ambiante) de transport pour les coupes tissulaires fixés et inclus en paraffine, il n'y a pas de délai d'acheminement à respecter.

En revanche, une attention toute particulière doit être apportée au moment de la coupe des blocs pour éviter les cross-contaminations entre blocs de tumeurs différentes, coupés de façon successive. Les techniques de biologie moléculaire faisant, le plus souvent, appel à des techniques d'amplification (PCR), le processus analytique est très sensible.

RESULTATS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de rendu des résultats (dans le cadre de l'acte N005, à savoir la cellularité, la qualification du prélèvement, ...) :

Réponse :

L'acte N005 ne génère pas un résultat en soi.

C'est une étape pré-analytique indispensable à toute analyse de génétique somatique qui garantit la représentativité de la zone tumorale qui sera analysée :

- en termes de pourcentage de cellules tumorales / nombre total de cellules de l'échantillon, permettant le choix de la méthode d'analyse moléculaire adapté à la sensibilité requise et l'interprétation correcte du résultat moléculaire. En effet, une absence de détection de mutation doit être mis en regard de la proportion de cellules tumorales susceptible de comporter cette mutation, présente dans l'échantillon transmis. En cas de cellularité tumorale trop faible, si un enrichissement par macrodissection n'a pas été possible, il est possible que l'analyse moléculaire ne soit pas en mesure de mettre en évidence une altération par manque de sensibilité analytique. Ce point est crucial dans l'interprétation biologique de tout résultat de génétique somatique.

- en termes de zone tumorale d'intérêt à analyser. En effet, les tumeurs étant hétérogènes, il est important qu'un professionnel compétent sélectionne la zone pertinente qui assurera un résultat biologique ayant un sens.

A qui sont communiqués les résultats (patient, ...) ?

Réponse :

L'acte N005 ne génère pas un résultat en soi.

Cependant, la cellularité tumorale est indiquée dans le CR de génétique somatique ainsi que le recours à une macrodissection, si cela a été le cas.

Il est à noter que même en cas de cellularité tumorale basse, l'analyse moléculaire est généralement effectuée. En effet, compte tenu des remaniements géniques des tumeurs, il est possible de détecter des mutations de gènes malgré un faible pourcentage de cellules tumorales par amplification ou surexpression de ce gène (augmentation de son nombre de copies ou des transcrits / cellules tumorales). Un biologiste moléculaire rend donc toujours la détection de mutations d'intérêt alors qu'il sera amené à nuancer, voire à rendre ininterprétable, une absence de détection de mutations d'intérêt en cas de cellularité tumorale faible. Dans ce dernier cas, le résultat est probablement le reflet du génotype des cellules normales, majoritaires dans le prélèvement, et n'a pas d'intérêt dans la prise en charge du patient.

Parmi les éléments cliniques demandés à la question M4, lesquelles sont nécessaires à la bonne interprétation du résultat ?

Réponse :

Tous les paramètres indiqués en M4.

R3

Certains dossiers complexes, nécessitent de consulter le dossier médical du patient. Lorsque l'échantillon à analyser émane d'un établissement extérieur au laboratoire effectuant l'analyse, le biologiste moléculaire peut être amené à contacter le clinicien ou le pathologiste prenant en charge le patient pour des informations complémentaires. Il est impossible de lister l'ensemble des situations. Mais ce domaine de la biologie à une forte composante de prestation de conseil, nécessite la participation à des RCP d'organe ou moléculaires et globalement des échanges multidisciplinaires importants.

INDICATION, PLACE DE L'INCLUSION EN PARAFFINE DANS LA GENETIQUE SOMATIQUE DES CANCERS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les indications retenues (type oncologique tissulaire ou d'organe – sarcome, cancer du côlon, etc. ... –, taille, localisation, âge du patient, ...) :

Réponse :

I1

Il est impossible de décrire l'ensemble des situations rencontrées en génétique somatique des cancers. La fixation-inclusion des tissus est un principe de base du conditionnement tissulaire qu'il soit dans un but d'analyse en pathologie ou d'analyse moléculaire. La génétique somatique des tumeurs est une discipline en continuité indissociable avec la pathologie.

L'augmentation des biomarqueurs moléculaires indispensables à la prise en charge personnalisée d'un grand nombre de cancers a été très importante ces 10 dernières années et s'est construit sur la base des échantillons tissulaires les plus largement disponibles : les tissus fixés et inclus en paraffine.

On peut dire que ce sont les techniques d'analyse moléculaires qui se sont adaptées et développées aux tissus disponibles et non l'inverse. Il est maintenant possible de faire des analyses haut débit sur ADN comme sur ARN issus de tissus fixés, ce qui n'était pas possible ou peu performant il y a encore quelques années.

Quels sont les avantages de l'inclusion en paraffine dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de la cryoconservation) ?

Réponse :

I2

La fixation-inclusion est le moyen de conditionnement de tout échantillon tissulaire dans n'importe quel laboratoire de pathologie. C'est donc son « universalité » qui est le principal avantage.

À cela s'ajoute la facilité de transmission de tels échantillons entre laboratoire et l'absence de conditions contraignantes d'acheminement et de conservation.

Quels sont les inconvénients de l'inclusion en paraffine dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de la cryoconservation) ?

Réponse :

- La fixation-inclusion dégrade et altère les acides nucléiques de façon plus ou moins importante selon de nombreux paramètres (type de fixateur, mais normalement uniforme sur le territoire français, temps de fixation, épaisseur de la pièce, type de tissu... etc.) pouvant créer des artefacts et de faux positifs.
- Il existe un taux d'échec analytique pouvant approcher les 10-15 % pour certaines analyses (NGS notamment) ne permettant pas de rendre un résultat fiable. Ceci s'observe le plus souvent avec des blocs anciens, conservés depuis > 5-10ans. En effet, la fixation-inclusion préserve la morphologie tissulaire mais la dégradation des acides nucléiques est un processus qui semble continu dans le temps.
- Les méthodologies analytiques doivent être adaptés à ces acides nucléiques altérés, notamment amplification de fragments géniques généralement <300bp, vigilance vis à vis des faux positifs.

Différentes publications discutent des avantages et inconvénients des tissus fixés et inclus :

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 Nov;138(11):1520-30. Bass BP1, Engel KB, Greytak SR, Moore HM.

Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. Fairley JA1, Gilmour K, Walsh K., Curr Drug Targets. 2012 Nov;13(12):1475-87.

I3

DIVERS

Cet acte est-il accréditable ? Si oui, sous quelle portée ?

Réponse :

Cet acte ne donnant pas lieu à résultat en soi, ce n'est pas un acte accréditable mais un sous processus quasi constant dans tout acte de génétique somatique des tumeurs.

D1

Quels sont les contrôles qualité mis en œuvre (internes et externes) ?

Réponse :

Il existe des contrôles qualité d'évaluation de la cellularité tumorale auquel tout laboratoire de génétique somatique participe sur le territoire français : le programme annuel EEQ Gen&Tiss. Ce programme a été mis en place lorsque les plateformes de génomique des tumeurs étaient labélisées par l'INCA et couvraient l'ensemble du territoire français. Généralement, l'EEQ est réalisé par la plateforme avec son correspondant pathologiste principal, il n'y a donc pas d'évaluation pour les autres correspondants pathologistes transmetteurs d'échantillons.

Également, avec l'élargissement des laboratoires réalisant les analyses de génétique des tumeurs (acteurs privés et publics) et l'augmentation des recours à l'analyse moléculaire de tissus tumoraux dans de nombreuses localisations tumorales, l'ensemble des laboratoires de pathologie ne font peut-être pas l'objet d'un EEQ.

Concernant la préparation des coupes tissulaires et le respect de conditions compatibles avec les analyses par PCR, c'est une information locale qui doit être mise en place entre

D2

laboratoire de génétique somatique et laboratoire de pathologie correspondant.

À ma connaissance, il n'existe pas d'EEQ évaluant l'ensemble du processus depuis la sélection du bloc, la préparation des coupes tissulaires, l'évaluation de la cellularité tumorale jusqu'au résultat de génétique somatique. Un tel EEQ semble impossible à mettre en œuvre. En revanche, le programme EEQ Gen&Tiss est le plus complet puisqu'il distribue des lames blanches aux laboratoires participants avec une évaluation de la cellularité tumorale, l'analyse de génétique somatique et l'analyse du compte rendu final.

Quelles sont les difficultés de mise en œuvre de la conservation et du transport ? Est-ce un facteur réduisant la qualité des acides nucléiques extraits ? Quelles mesures conservatoires seraient souhaitables ?

Réponse :

Comme énoncé au-dessus, c'est la fixation-inclusion elle-même qui est responsable de la dégradation des acides nucléiques. Dégradation qui semble continuer lors d'une conservation prolongée des blocs. À ma connaissance, il n'existe pas de mesures consensuelles pour réduire la qualité des acides nucléiques extraits de tels prélèvements.

D3

En revanche, il est déconseillé de conserver au long cours, des coupes tissulaires (lames blanches) pour une utilisation ultérieure pour biologie moléculaire, la conservation étant aléatoire. Ceci est un principe qui s'applique également aux analyses de pathologie telles que l'immunohistochimie ou la FISH.

Il est également à noter que les conditions de conservation et d'acheminement depuis le bloc opératoire ou le lieu de prélèvement du tissu tumoral jusqu'au laboratoire de pathologie AVANT fixation et inclusion, jouent un rôle majeur (temps d'ischémie froide, rapidité de préservation pour les ARN, artefacts d'électrocoagulation... etc.). Cet aspect est traité par le pathologiste dont c'est le domaine de compétence.

Annexe 7. Réponse du Conseil national professionnel des pathologistes (CNPath) sur l'évaluation de l'acte N006

METHODE

Pour quels tissus et liquides biologiques, la sélection et la préparation d'un échantillon tissulaire congelé pour une analyse en génétique somatique des cancers, vous paraissent-elles pertinentes ?

M1

Réponse :

La question ne se pose évidemment que pour les tissus, pas pour les liquides biologiques. Tous les tissus peuvent faire l'objet d'une cryopréservation, lorsqu'elle est justifiée par la question posée. Les recommandations nationales et internationales insistent sur le fait que tout échantillon tissulaire doit faire l'objet d'une sélection et d'un contrôle histologique avant l'analyse moléculaire.

Quels éléments avez-vous mis en place pour assurer une traçabilité optimale des échantillons ?

M2

Réponse :

Les échantillons doivent être accompagnés d'un bon de demande comportant l'identification du patient, celle du prescripteur, celle du préleveur, la nature de l'échantillon, les informations sur le prélèvement, le site de prélèvement. Les échantillons doivent être enregistrés et tracés dans le système de gestion informatique du laboratoire de pathologie au même titre que tous les échantillons utilisés dans le cadre du diagnostic anatomopathologique.

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de prélèvement que vous recommandez ?

M3

Réponse :

Il n'y a pas de modalité de prélèvement (au sens strict) spécifique aux échantillons destinés à l'analyse moléculaire. Lorsque les échantillons proviennent de pièces opératoires, ils doivent être prélevés par un pathologiste ou sous sa responsabilité après réception au laboratoire de pathologie. Le point essentiel est d'assurer une cryopréservation rapide selon les procédures indiquées par les recommandations de bonnes pratiques disponibles nationalement et internationalement et de maîtriser la chaîne du froid avant et après la cryopréservation.

Quels éléments cliniques sont demandés ou attendus ?

M4

Réponse :

Le bon de demande doit comporter le type de tumeur attendu, la nature des examens moléculaires demandés, le contexte clinique justifiant la demande d'analyse moléculaire (évaluation initiale, résistance au traitement, rechute, métastase ...) et la justification du recours à un échantillon cryoprélevé plutôt que fixé.

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de préparation, de transport et de conservation ou tout commentaire qui vous semblerait pertinent concernant la phase pré-analytique (nature de la fixation, délais acceptés, ...) :

M5

Réponse :

La technique de cryopréservation doit être décrite (exemples : cryopréservation simple, après passage dans un liquide de préservation type RNAlater, après inclusion dans un milieu d'enrobage type OCT). Le délai entre le prélèvement et la cryopréservation doit être noté et inférieur à 30 minutes idéalement.

RESULTATS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de rendu des résultats (dans le cadre de l'acte N006, à savoir la cellularité, la qualification du prélèvement, ...) :

R1

Réponse :

Le rendu des résultats doit se faire sous la forme d'un compte rendu structuré indiquant les identifiants du patient, la nature et le site de l'échantillon, ses identifiants, le contexte clinique, ainsi que les éléments décrivant la qualité de l'échantillon : taille (grand diamètre ou surface de la section examinée), présence de tumeur (et éventuellement, discordance du type tumoral observé avec le type tumoral attendu selon les données cliniques transmises), cellularité tumorale (estimée selon les recommandations, comme un pourcentage du nombre total de cellules), les facteurs confondants éventuels (nécrose, éventuellement évaluée en surface de la section examinée, cellules « normales » éventuellement présentes, cellules stromales dont les cellules immunitaires, fibrose, et tout autre facteur d'intérêt). Il faut insister sur le fait que le contrôle histologique est souvent plus difficile à réaliser à partir d'une coupe de tissu cryopréserve que d'une coupe de tissu fixé et inclus en paraffine (moins bonne préservation morphologique compliquant l'analyse microscopique et pouvant entraîner des difficultés d'évaluation de certains paramètres clés).

A qui sont communiqués les résultats (patient, ...) ?

R2

Réponse :

Les résultats sont communiqués au responsable de l'analyse moléculaire en aval et inclus dans le dossier médical du patient.

Parmi les éléments cliniques demandés à la question M4, lesquels sont nécessaires à la bonne interprétation du résultat ?

R3

Réponse :

Contexte clinique, type de tumeur attendu.

INDICATION, PLACE DE LA CONGELATION DANS LA GENETIQUE SOMATIQUE DES CANCERS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les indications retenues (type oncologique tissulaire ou d'organe – sarcome, cancer du côlon, etc. ... –, taille, localisation, âge du patient, ...) :

I1

Réponse :

Les indications ont été fixées par l'INCa et restent d'actualité. D'une façon générale, cette approche peut être recommandée pour les tumeurs solides survenant chez l'enfant, l'adolescent, et l'adulte de moins de 40 ans.

Quels sont les avantages de la congélation dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de l'inclusion en paraffine) ?

I2

Réponse :

Possibilité de réaliser des analyses moléculaires plus exhaustives (WGS, WES, méthylation) dans de meilleures conditions, plus grande sensibilité.

Quels sont les inconvénients de la congélation dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de l'inclusion en paraffine) ?

I3

Réponse :

Non accessible sur tous les sites de prélèvement, manipulation et transport plus complexes, difficultés spécifiques du contrôle histologique de la qualité de l'échantillon.

DIVERS

Cet acte est-il accréditable ? Si oui, sous quelle portée ?

D1

Réponse :

L'acte est un acte d'anatomie pathologique et donc, en tant que tel, ne relève pas d'une accréditation obligatoire. Il est accréditable sur la base d'une démarche volontaire. Domaine : Anatomie et Cytologie pathologiques – Sous-famille : Histologie (HISTOACP).

Quels sont les contrôles qualité mis en œuvre (internes et externes) ?

D2

Réponse :

Des contrôles internes (contrôle de la cellularité, concordance avec les résultats moléculaires) sont souhaitables. Les contrôles externes sont à organiser.

Quels sont les difficultés de mise en œuvre de la conservation et du transport ? Est-ce un facteur réduisant la qualité des acides nucléiques extraits ? Quelles mesures conservatoires seraient souhaitables ?

Réponse :

D3

Pas de difficulté spécifique par rapport aux autres échantillons cryopréservés (respect des bonnes pratiques de conservation établies par la spécialité). Il est conseillé de conserver les lames de contrôle histologique, sous forme physique ou sous forme numérique, pendant une durée appropriée à la réalisation des analyses moléculaires et au suivi du patient.

Annexe 8. Réponse du Conseil national professionnel de biologie médicale sur l'évaluation de l'acte N006

METHODE

Pour quels tissus et liquides biologiques, la sélection et la préparation d'un échantillon tissulaire congelé pour une analyse en génétique somatique des cancers, vous paraissent-elles pertinentes ?

Réponse :

La nécessité du recours aux tissus congelés est de plus en plus retreinte pour les analyses de génétique somatique, la plupart des analyses de routine ayant été adaptées à la qualité des acides nucléiques issus de tissus fixés et inclus en paraffine, beaucoup plus répandus. Néanmoins, il reste utile de pouvoir accéder à du tissu cryopréservé lorsque les analyses sur tissu fixé et inclus sont non contributives (parfois jusqu'à 10-15 % des cas). Également, dans le cadre des plateformes France Génomique, jusqu'à présent, une exigence de tissus congelés est demandée pour les analyses d'exomes et de transcriptomes. Ce point pouvant probablement évoluer à l'avenir.

L'accès à des analyses de haut débit sur cellules isolées (*single cell*) nécessite également le recours à la cryopréservation après une étape de dissociation tissulaire. Ce type de prélèvement est important si on veut explorer, entre autres, l'hétérogénéité tissulaire ou le microenvironnement tumoral mais relève encore, à ce jour, du domaine de la recherche.

Enfin, dans le cadre des centres experts en cancérologie (CEX), un des critères étaient un taux de cryopréservation des échantillons de 30 %, permettant d'assurer une recherche translationnelle de qualité. Mais seuls les centres universitaires étaient souvent en capacité d'assurer cette cryopréservation dans un délai rapide et un stockage à long terme.

A priori, tous les tissus tumoraux peuvent être concernés par une cryopréservation systématique.

Quels éléments avez-vous mis en place pour assurer une traçabilité optimale des échantillons ?

Réponse :

L'identification du prélèvement doit être faite sur le cryotube en veillant à la lisibilité permanente de l'identité avec n° d'enregistrement en pathologie et si possible les premières initiales du nom et prénom (caractères de taille suffisante, majuscules, encre noire permanente, crayons et/ou étiquettes cryogéniques).

Avant utilisation, le prélèvement doit faire l'objet d'une analyse microscopique pour évaluer la cellularité tumorale.

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de prélèvement que vous recommandez ?

Réponse :

De façon générale, les modalités de prélèvement en cas de cryoconservation doivent respecter :

- Un délai entre le prélèvement et la congélation de tissus tumoraux le plus court possible pour la préservation des ARN dont la demi-vie peut être de l'ordre de quelques minutes
- Pour les analyses qui nécessitent une étape de mise en culture ou de recueil de cellules viables, les manipulations du prélèvement doivent être réalisées en conditions stériles et les procédures de congélation doivent préserver la viabilité des cellules.
- Un contrôle microscopique de la nature de la lésion et de la représentativité des prélèvements congelés est indispensable, comme pour toute analyse de génétique somatique des tumeurs (même principe que pour les tissus fixés et incus).

Ces circuits sont contraignants en termes de rapidité de mise en œuvre, disponibilité de fluide réfrigérant (généralement azote liquide), enceintes froides ou containers d'azote et de formation du personnel pour la manipulation dans des conditions optimales de sécurité.

Différents documents ont été rédigés par des instances réglementaires en France pour encadrer cette cryopréservation :

https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-02/cryopreservation_recommandations.pdf

INCA « Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie – actualisation 2011 des indications et recommandations aux tumorothèques », collection Référentiels et Recommandations, INCa, Boulogne-Billancourt, novembre 2011.

Quels éléments cliniques sont demandés ou attendus ?

Réponse :

Les éléments sont identiques à ceux énoncés pour l'acte N005 :

Dans le but de réaliser une analyse dans les conditions de juste prescription et permettre une interprétation circonstanciée des génotypes mis en évidence, il est indispensable de connaître le contexte clinique de la demande, certains paramètres pathologiques (dépendants de l'organe considéré) et la raison de cette prescription (recherche de biomarqueurs diagnostiques, théranostiques, pronostiques, recherche de mécanismes de résistance à une thérapeutique...etc.). Ces éléments relèvent du clinicien mais également du pathologiste et nécessitent donc la mise en place de feuilles de prescription, qui accompagnent l'échantillon tout au long du processus.

Il est à noter que certains biomarqueurs diagnostiques sont demandés directement par le pathologiste pour rentrer dans sa démarche diagnostique histo-moléculaire, dans ce cas le résultat est rendu uniquement au pathologiste qui synthétise les données et pose son diagnostic, qui sera ensuite transmis au clinicien.

M4

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de préparation, de transport et de conservation ou tout commentaire qui vous semblerait pertinent concernant la phase pré-analytique (nature de la fixation, délais acceptés, ...) :

M5

Réponse :

Pour les prélèvements tissulaires, il est souhaitable que le fragment soit mis à plat et orienté sur un support rigide (type lamelle de verre stérile) qui sera introduit dans le tube de congélation. Ceci permet de réaliser plus facilement des coupes lorsque le fragment est congelé. Il peut être nécessaire d'utiliser des milieux d'enrobage pour permettre la coupe

au cryostat.

La congélation doit se faire le plus rapidement possible par immersion du tube dans le fluide réfrigérant. La chaîne du froid ne doit pas être rompue jusqu'à l'utilisation finale du prélèvement.

La conservation des prélèvements soit en azote liquide, soit en vapeurs d'azote liquide, soit en congélateur garantissant le maintien d'une température inférieure à moins 70°C est indispensable.

RESULTATS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les modalités de rendu des résultats (dans le cadre de l'acte N006, à savoir la cellularité, la qualification du prélèvement, ...) :

Réponse :

Tout comme l'acte N005, l'acte N006 ne génère pas un résultat en soi.

C'est une étape pré-analytique indispensable à toute analyse de génétique somatique qui garantit la représentativité de la zone tumorale qui sera analysée :

- en termes de pourcentage de cellules tumorales / nombre total de cellules de l'échantillon, permettant le choix de la méthode d'analyse moléculaire adapté à la sensibilité requise et l'interprétation correcte du résultat moléculaire. En effet, une absence de détection de mutation doit être mise en regard de la proportion de cellules tumorales susceptible de comporter cette mutation, présente dans l'échantillon transmis. En cas de cellularité tumorale trop faible, si un enrichissement par macrodissection n'a pas été possible, il est possible que l'analyse moléculaire ne soit pas en mesure de mettre en évidence une altération par manque de sensibilité analytique. Ce point est crucial dans l'interprétation biologique de tout résultat de génétique somatique.

- en termes de zone tumorale d'intérêt à analyser. En effet, les tumeurs étant hétérogènes, il est important qu'un professionnel compétent sélectionne la zone pertinente qui assurera un résultat biologique ayant un sens.

A qui sont communiqués les résultats (patient, ...) ?

Réponse :

Tout comme l'acte N005, l'acte N006 ne génère pas un résultat en soi.

Cependant, la cellularité tumorale est indiquée dans le CR de génétique somatique ainsi que le recours à une macrodissection, si cela a été le cas.

Il est à noter que même en cas de cellularité tumorale basse, l'analyse moléculaire est généralement effectuée. En effet, compte tenu des remaniements géniques des tumeurs, il est possible de détecter des mutations de gènes malgré un faible pourcentage de cellules tumorales par amplification ou surexpression de ce gène (augmentation de son nombre de copies ou des transcrits /cellules tumorales). Un biologiste moléculaire rend donc toujours la détection de mutations d'intérêt alors qu'il sera amené à nuancer, voire à rendre ininterprétable, une absence de détection de mutations d'intérêt en cas de cellularité tumorale faible. Dans ce dernier cas, le résultat est probablement le reflet du génotype des cellules normales, majoritaires dans le prélèvement, et n'a pas d'intérêt dans la prise en charge du patient.

Parmi les éléments cliniques demandés à la question M4, lesquels sont nécessaires à la bonne interprétation du résultat ?

Réponse :

Tous les paramètres indiqués en M4.

R3

Certains dossiers complexes, nécessitent de consulter le dossier médical du patient. Lorsque l'échantillon à analyser émane d'un établissement extérieur au laboratoire effectuant l'analyse, le biologiste moléculaire peut être amené à contacter le clinicien ou le pathologiste prenant en charge le patient pour des informations complémentaires. Il est impossible de lister l'ensemble des situations. Mais ce domaine de la biologie à une forte composante de prestation de conseil, nécessite la participation à des RCP d'organe ou moléculaires et globalement des échanges multidisciplinaires importants.

INDICATION, PLACE DE LA CONGELATION DANS LA GENETIQUE SOMATIQUE DES CANCERS

Pouvez-vous décrire pour chaque tissu et liquide biologique identifiés à la question M1 les indications retenues (type oncologique tissulaire ou d'organe – sarcome, cancer du côlon, etc. ... –, taille, localisation, âge du patient, ...) :

I1

Réponse :

Comme indiqué en M1, le recours aux prélèvements cryopréservés en routine pour l'analyse de génétique somatique des tumeurs, est aujourd'hui restreinte à des cas particuliers : échecs sur tissus fixés, analyses haut débit nécessitant des acides nucléiques d'excellente qualité (exomes, transcriptomes), tests fonctionnels.

Quels sont les avantages de la congélation dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de l'inclusion en paraffine) ?

I2

Réponse :

L'intérêt de la cryopréservation est de pouvoir disposer de fragments tissulaires tumoraux permettant d'obtenir des acides nucléiques (ADN et ARN) d'excellente qualité, à condition que l'étape de congélation ait été réalisée de façon optimale (rapidité, maintien de la chaîne du froid). La cryopréservation permet également de mettre en œuvre des analyses sur cellules viables, plutôt du domaine de la recherche.

En revanche, ceci est réservé, le plus souvent, à des centres experts qui ont les capacités de réaliser cette cryopréservation et de la maintenir dans le temps.

Quels sont les inconvénients de la congélation dans la génétique somatique des cancers (notamment vis-à-vis de l'inclusion en paraffine) ?

I3

Réponse :

Le principal inconvénient est la nécessité de la mise en place d'un circuit particulier qui n'est envisageable, la plupart du temps, que dans un grand établissement. Ceci nécessite

une infrastructure et du personnel qualifié et la mise en place de procédures strictes impliquant l'ensemble des acteurs (préleveurs, pathologistes, biologistes moléculaires). Ce processus est coûteux au moment du prélèvement mais également tout au long de la conservation à long terme qui nécessite matériel, personnel et fluides réfrigérants ou enceintes froides avec surveillance des températures.

DIVERS

Cet acte est-il accréditable ? Si oui, sous quelle portée ?

D1

Réponse :

Cet acte ne donnant pas lieu à résultat en soi, ce n'est pas un acte accréditable mais un sous processus qui peut intervenir dans tout acte de génétique somatique des tumeurs.

Quels sont les contrôles qualité mis en œuvre (internes et externes) ?

D2

Réponse :

Globalement, les réponses apportées sont les mêmes que pour du tissu fixé et inclus en paraffine.

Il existe des contrôles qualité d'évaluation de la cellularité tumorale, auxquels tout laboratoire de génétique somatique participe sur le territoire français : le programme annuel EEQ Gen&Tiss. Cependant, à ma connaissance, il n'existe pas d'EEQ évaluant le processus sur du matériel congelé.

Quels sont les difficultés de mise en œuvre de la conservation et du transport ? Est-ce un facteur réduisant la qualité des acides nucléiques extraits ? Quelles mesures conservatoires seraient souhaitables ?

D3

Réponse :

La contrainte majeure du maintien de la chaîne du froid est le principal frein à l'utilisation de ce type de conservation pour les tissus, même si cela préserve une qualité optimale des acides nucléiques pour analyse moléculaire.

En cas de transmission de matériel sous forme congelée, et non sous forme d'ADN ou d'ARN, il faut éviter toute rupture de la chaîne du froid.

Avant toute analyse moléculaire, un contrôle anatomopathologique microscopique est indispensable préalable pour vérifier que le prélèvement concerne bien une zone tumorale et apprécie la qualité du tissu (cellularité, proportion de cellules tumorales, nécrose, ...). Ceci oblige à manipuler le prélèvement (réalisation de coupes pour contrôle HES) ce qui peut compromettre sa qualité si la chaîne du froid n'est pas strictement respectée.

L'acheminement des échantillons cryopréservés nécessite également un circuit coûteux en carboglace.

Pour toutes ces contraintes lourdes, le prélèvement fixé et inclus en paraffine est largement privilégié dans la routine de l'analyse de génétique somatique des tumeurs.

Références

1. Haute Autorité de Santé. Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin. Recommandations de bonne pratique. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2009.
https://www.has-sante.fr/jcms/c_923153/fr/cryopreservation-de-tissus-cellules-et-liquides-biologiques-issus-du-soin
2. Institut national du cancer. Conservation et utilisation des échantillons tumoraux en cancérologie. Actualisation 2011 des indications et recommandations aux tumeurs. Boulogne-Billancourt: INCa; 2011.
http://www.e-cancer.fr/content/download/63216/569037/file/RECOC_RYOTUM11.pdf
3. Hastings RJ, Bown N, Tibiletti MG, Debiec-Rychter M, Vanni R, Espinet B, *et al.* Guidelines for cytogenetic investigations in tumors. Eur J Hum Genet 2016;24(1):6-13.
<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2015.35>
4. Japanese Society of Medical Oncology, Taniguchi H, Yamazaki K, Yoshino T, Muro K, Yatabe Y, *et al.* Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: RAS (KRAS/NRAS) mutation testing in colorectal cancer patients. Cancer Sci 2015;106(3):324-7.
<http://dx.doi.org/10.1111/cas.12595>
5. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, Normanno N, Edsjö A, Rouleau E, *et al.* Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. J Clin Pathol 2014;67(11):923-31.
<http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202404>
6. College of American Pathologists, National Society for Histotechnology, Lott R, Tunnicliffe J, Sheppard E, Santiago J, *et al.* Pre-microscopic examination specimen handling guidelines in the surgical pathology laboratory. Northfield: CAP; 2014.
https://webapps.cap.org/apps/docs/proficiency_testing/pre-examination.pdf
7. College of American Pathologists, National Society for Histotechnology, Brown RW, Della Speranza V, Alvarez JO, Eisen RN, *et al.* Uniform labeling of blocks and slides in surgical pathology. Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center and the National Society for Histotechnology. Arch Pathol Lab Med 2015;139(12):1515-24.
<http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2014-0340-SA>
8. Royal College of Pathologists, Institute of Biomedical Science. The retention and storage of pathological records and specimens. 5th edition. Guidance from the Royal College of Pathologists and the Institute of Biomedical Science. London: RCP; 2015.
<https://www.rcpath.org/uploads/assets/049ea966-df5c-4a9f-9353ba24a69bb808/The-retention-and-storage-of-pathological-records-and-specimens-5th-edition.pdf>
9. Comité français d'accréditation. Guide technique d'accréditation en anatomie et cytologie pathologiques. Paris: COFRAC; 2013.
<https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-03>
10. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques. Gestion des tissus inclus en paraffine. Ann Pathol 2015;35(3):203-5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.annpat.2015.04.001>
11. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques. Recommandations de bonnes pratiques en anatomie et cytologie pathologiques v2. Gestion des tissus inclus en paraffine. Strasbourg: AFAQP; 2009.
http://www.afaqap.fr/sites/default/files/rbpacp_v2_2014_08_22.pdf
12. College of American Pathologists, National Society for Histotechnology, Lott R, Tunnicliffe J, Sheppard E, Santiago J, *et al.* Practical guide to specimen handling in surgical pathology. Northfield: CAP; 2018.
<https://cap.objects.frb.io/documents/practical-guide-specimen-handling.pdf>
13. Uguen A, Guibourg B, Guéguen P. Standardized fixation process is crucial to permit molecular analyses in formalin-fixed and paraffin-embedded melanoma samples [letter]. Clin Chem Lab Med 2016;54(11):e359-e60.
<http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2016-0397>
14. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. Methods 2014;70(1):12-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.022>
15. Ministère du travail, de l'emploi et de la santé. Rapport anatomie et cytologie pathologiques. Paris: Ministère du travail, de l'emploi et de la santé; 2012.
https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Anatomie_cytologie_pathologiques.pdf
16. Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé. Principes de mise en œuvre d'une démarche qualité en établissement de santé. Paris: ANAES; 2002.
https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/demarche_qualite_2006_10_06_10_16_43_41.pdf
17. Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Journal Officiel 2010;15 janvier 2010:819.

Fiche descriptive

Intitulé	Descriptif
Méthode de travail	Évaluation d'une technologie de santé
Date de mise en ligne	Décembre 2019
Date d'édition	Uniquement disponible sous format électronique sur www.has-sante.fr
Objectif(s)	Préciser l'intérêt, les indications et les modalités de réalisation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomocytopathologie, en vue d'une analyse en génétique somatique des cancers.
Professionnel(s) concerné(s)	Cf. chapitre 3.3.1
Demandeur	Direction générale de l'offre de soins (DGOS) et la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS)
Promoteur	Haute Autorité de santé (HAS), service évaluation des actes professionnels (SEAP)
Pilotage du projet	Coordination : Sébastien BINE, chef de projet, SEAP (chef de service : Cédric CARBONNEIL, adjoint au chef de service : Nadia SQUALLI) Secrétariat : Louise TUIL, assistante, SEAP
Recherche documentaire	De juillet 2019 à novembre 2019 (stratégie de recherche documentaire décrite en Annexe 1) Réalisée par Emmanuelle BLONDET, documentaliste, avec l'aide de Sylvie LASCOLS, assistante documentaliste, sous la responsabilité de Frédérique PAGES, chef du service documentation - veille, et Christine DEVAUD, adjointe au chef de service
Auteurs de l'argumentaire	Sébastien BINE, chef de projet, SEAP, sous la responsabilité de Nadia SQUALLI, adjointe au chef de service, SEAP
Validation	Collège de la HAS : décembre 2019
Autres formats	Pas d'autre format que le format électronique disponible sur www.has-sante.fr
Documents d'accompagnement	Feuille de route (juillet 2019), décision HAS (décembre 2019), avis HAS (décembre 2019) disponibles sur www.has-sante.fr

~



Toutes les publications de la HAS sont téléchargeables sur
www.has-sante.fr