

8.7 Annexe 7 – Gestion des tissus inclus en paraffine

Cette annexe aborde la prise en charge de l'échantillon tissulaire entre le moment de l'acte de prélèvement sur le patient et celui de l'éventuelle analyse moléculaire, qu'elle soit réalisée sur lame ou en phase liquide sur tube. Ce processus peut correspondre à la phase dite pré-analytique de la norme ISO 15189¹.

Les procédures permettant de préserver les marqueurs moléculaires (protéines et acides nucléiques en particulier) et de standardiser leur analyse concernent les modalités de prélèvement, de transport, de fixation du tissu et de réalisation du bloc en paraffine ou de la lame blanche.

Ces modalités dépendent des marqueurs recherchés, des techniques utilisées (IHC, HIS, PCR, RT-PCR ou NGS) et du type de prélèvement : pièces opératoires de grande taille ou de petite taille, fragments biopsiques.

Les étapes du processus impliquées concernent :

- Les conditions de l'obtention du prélèvement tissulaire sur le patient ;
- Son transport vers la structure d'ACP ;
- Sa prise en charge dans la structure d'ACP jusqu'à la stabilisation des propriétés du tissu avant analyse moléculaire.

De façon générale :

- Le niveau d'exigence de la prise en charge est adapté aux besoins de l'analyse. Ces besoins peuvent être organes- ou lésions-dépendants et se modifier au fil du temps et de l'évolution des connaissances et des techniques. De ce fait ils sont à réévaluer périodiquement.
- La formation des différents acteurs impliqués dans ce processus (médecin en charge des prélèvements, coursier/transporteur, pathologiste en charge du diagnostic et de la qualification des tissus) est assurée. Les actions de chacun sont définies par des procédures écrites et sont tracées. Cela nécessite une contractualisation entre les partenaires, en adéquation avec les textes réglementaires et les normes en vigueur.
- Les implications médico-légales et les impacts financiers de ces actions ne sont pas abordés dans cette annexe organisationnelle.

Cette annexe complète certains chapitres du document princeps des RBPACP v2 de 2009 :

Chapitre 3.3 : Conditionnement et transmission du prélèvement

Chapitre 3.4 : Réception et enregistrement du prélèvement

Chapitre 4.1 : Macroscopie

Chapitre 4.4 : Techniques complémentaires

¹ Extrait du SH GTA 03 : La phase pré-analytique peut être arrêtée à l'enregistrement du prélèvement dans la structure d'ACP ou à la lame blanche, restreignant dans cette dernière option la phase analytique à la révélation d'un signal : coloration sur lame (HE/HES, coloration spéciale, IHC, HIS) ou analyse sur tube (PCR par ex.). Le découpage n'offre qu'un cadre de travail sur le processus technique global d'ACP ; il peut au besoin ne pas être utilisé par les structures afin de s'approprier spécifiquement la démarche d'accréditation. Quel que soit le choix retenu, l'essentiel est d'identifier dans toutes les étapes de processus et tous les intervalles entre ces étapes les points critiques pour lesquels une action de maîtrise est nécessaire pour prévenir et réduire un ou plusieurs risques identifiés.

Chapitre 4.7 : Gestion du prélèvement cryopréservé

Chapitre 5.4 : Transmission de lames et/ou blocs à l'extérieur de la structure ACP

Chapitre 6 : Archivage

Chapitre 8.2 : Annexe 2 – Techniques IHC/ICC

Chapitre 8.3 : Annexe 3 – Techniques de biologie moléculaire.

8.7.1 Définition d'éléments clés du processus

Le prélèvement est la pièce opératoire ou le fragment biopsique.

L'échantillon est la portion de tissu destinée à l'analyse sur lame ou sur tube. Il est censé être représentatif de la lésion.

L'échantillon subit des modifications physico-chimiques jusqu'à sa stabilisation dans la paraffine.

On distingue **l'échantillon initial ou primaire**, issu directement de l'acte opératoire ou biopsique, obtenu au moment du prélèvement (ou à un moment rapproché de celui du prélèvement), de **l'échantillon final** (lame ou copeau).

L'échantillon initial est une « carotte » tissulaire lorsque le prélèvement est réalisé par ponction-biopsie ou un fragment millimétrique lors d'une biopsie endoscopique. En cas de pièce opératoire, l'échantillon initial est un fragment centimétrique de la lésion. Il résulte d'un geste d'échantillonnage réalisé immédiatement au bloc opératoire (ou dans son environnement immédiat : examen extemporané) ou pendant le temps de la macroscopie dans la structure d'ACP.

8.7.2 Gestion initiale du prélèvement

Les locaux de prélèvements opératoires ou biopsiques sont équipés pour le conditionnement des pièces/fragments avant leur acheminement vers la structure d'ACP.

La date et l'heure du prélèvement sont mentionnées sur le formulaire de demande d'examen.

L'acheminement vers la structure d'ACP se fait selon des modalités de conditionnement et de délais définies avec le pathologiste.

L'heure de fixation des pièces opératoires est relevée.

8.7.2.1 Fragments biopsiques

Sauf protocoles particuliers, les fragments sont fixés immédiatement.

Les personnels sont informés des règles de manipulation à respecter.

8.7.2.2 Pièces opératoires

La durée d'ischémie chaude d'une pièce opératoire (délai entre la dévascularisation et l'extraction de la pièce) ne fait pas l'objet d'une mesure (sauf exigence d'un protocole particulier de recherche clinique).

La durée d'ischémie froide (délai entre l'extraction de la pièce et sa fixation) est déterminable.

La pièce opératoire peut être acheminée à l'état frais vers la structure d'ACP. Le temps de transport doit alors être maîtrisé et défini en accord avec le prescripteur. Le fait de placer la pièce opératoire dans une atmosphère froide (4°C) permet d'allonger du double la durée de transport.

En cas de fixation sur le site de prélèvement, les personnels sont informés des règles de manipulation à respecter.

8.7.3 Transport

L'emballage et le transport respectent la réglementation.

Le personnel assurant le transport est informé sur la nature du contenu des emballages et sur les modalités d'acheminement à respecter.

L'heure de prise en charge du transport et l'heure de dépôt dans la structure d'ACP sont relevées par le transporteur.

8.7.4 Prise en charge dans la structure d'ACP

Dans la structure d'ACP, le pathologiste met en place les procédures techniques permettant aux blocs en paraffine/lames blanches paraffinées de conserver au mieux leur propriétés moléculaires. Il maîtrise la durée de fixation, s'assure du fonctionnement approprié de l'automate d'imprégnation conforme aux spécificités définies par le constructeur (qualité de réactifs, maintenance, etc.) et les températures d'enrobage, de déplissage des coupes et de séchage des lames.

Lors de la coupe des tissus en vue d'analyses moléculaires utilisant la PCR, il prévient la « contamination » d'un tissu par un autre en mettant en place des procédures adaptées (plage d'utilisation dédiée d'un microtome, conditions de travail « RNase free »).

8.7.5 Points critiques

Une fixation maîtrisée est un prérequis indispensable pour l'obtention d'analyses moléculaires fiables.

Le formaldéhyde tamponné à 4% « formol » est le fixateur de référence. L'utilisation d'autres fixateurs est possible mais elle demande une validation de méthode adaptée.

Pour les biopsies, la fixation est immédiate. Les pièces opératoire volumineuses et pleines requièrent une instillation du fixateur ou un tranchage préalable afin d'assurer une fixation harmonieuse du tissu.

Les durées de fixation sont à adapter en fonction de la taille de la pièce. A titre indicatif, la durée de fixation standard d'une biopsie est de 6 à 48h et la durée de fixation standard d'une pièce opératoire est de 24 à 72h. Ces temps peuvent être modifiés en fonction des circonstances (type de tissu, besoin clinique particulier), en notant que :

- les effets d'une sous-fixation ne sont pas techniquement rattrapables ;
- les effets d'une sur-fixation sont techniquement rattrapables, sous réserve de protocoles adaptés (par ex. en IHC restauration antigénique spécifique) ; une telle adaptation n'est envisageable que lorsque la notion de sur-fixation est connue.

Afin de limiter la durée d'immersion dans le fixateur de l'appareil à imprégnation les weekends et/ou les jours fériés, il est recommandé d'adapter le protocole par la mise en place d'une étape d'attente.

8.7.6 Adaptation du formulaire de demande et de la « feuille de paillasse »

Cette adaptation a pour objet de pouvoir :

1. identifier *a posteriori* les intervenants impliqués dans les étapes clés (points critiques) du processus ;
2. connaître *a posteriori* les horaires/durées de ces étapes.

8.7.7 Détermination de la cellularité pour analyse moléculaire par PCR/RT-PCR

La définition de la cellularité est à relier au besoin de l'analyse. Une concentration minimale en noyaux tumoraux du tissu (par rapport à tous les noyaux du tissu) est requise pour éviter un résultat d'analyse faussement négatif. A ce titre, les cellules normales (épithéliales et du stroma, parmi lesquelles les lymphocytes sont parfois prédominants) ont un effet de dilution. Cette concentration minimale diffère selon la sensibilité de chaque techniques moléculaires.

Par extrapolation, il s'agit du nombre total de cellules tumorales viables rapporté au nombre total de cellules, tous types confondus, en particulier en intégrant les lymphocytes (dans la zone tissulaire soumise à l'analyse de biologie moléculaire). Le résultat est exprimé en %.

La détermination de ce % n'a pas à être réalisée à l'unité près. Les résultats de la cellularité tumorale peuvent par ex. se répartir en 3 groupes :
cellularité infime : <1% ; cellularité faible à intermédiaire (<30%) avec 6 sous-groupes : 1-4%, 5-9%, 10-14%, 15-19%, 20-24%, 25-29% ; cellularité forte (≥30%) avec 3 sous-groupes : 30%, 50% ou 80%.

Il convient si possible de ne pas transmettre pour analyse moléculaire de larges zones de nécrose et de mucus. Lorsque de telles zones persistent dans l'échantillon transmis, il y a lieu d'en apprécier la quantité : surface occupée par la nécrose (ou le mucus) rapportée à la surface totale de la préparation soumise à l'analyse moléculaire. Le résultat est exprimé en %.

Sur matériel biopsique avec peu de cellules tumorales, il est demandé de fournir le nombre approximatif de cellules (< ou >100 cellules tumorales) en plus de la cellularité tumorale (%).

Le type de matériel utilisé pour l'analyse moléculaire (lames blanches, copeaux, punch) est laissé à la discrétion des intervenants.

Document élaboré par le conseil d'administration de l'AFAQAP.

Validé le 3 octobre 2014.