




This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
 www.em-consulte.com



MISE AU POINT

Rôle du laboratoire d'anatomie pathologique dans l'approche pré-analytique des examens de biologie moléculaire réalisés en pathologie tumorale

Role of the surgical pathology laboratory in the pre-analytical approach of molecular biology techniques

Véronique Hofman^{a,b}, Marius Ilie^{a,b},
 Virginie Gavric-Tanga^b, Virgine Lespinet^b,
 Mireille Mari^a, Sandra Lassalle^{a,b}, Catherine Butori^{a,b},
 Céline Coelle^b, Olivier Bordone^b, Eric Selva^b,
 Aude Lamy^c, Jean-Christophe Sabourin^c,
 Paul Hofman^{a,*,b}

^a Laboratoire de pathologie clinique et expérimentale, hôpital Pasteur, CHU de Nice, 30, avenue de la Voie-Romaine, BP 69, 06002 Nice cedex, France

^b Tumorothèque/CRB, hôpital Pasteur, CHU de Nice, 30, avenue de la Voie-Romaine, BP 69, 06002 Nice cedex, France

^c Plateforme tumorothèque-laboratoire de génétique somatique des tumeurs, service d'anatomie pathologique, CHU de Rouen, 1, rue de Germont, 76031 Rouen cedex, France

Accepté pour publication le 9 mars 2010

Disponible sur Internet le 13 avril 2010

MOTS CLÉS

Biologie moléculaire ;
 Tissu ;
 ADN ;
 ARN ;
 Fixateur ;
 Congélation

Résumé L'avènement des thérapies ciblées administrées aux patients, en fonction des résultats des examens de biologie moléculaire (en particulier de l'hybridation in situ, de l'amplification par *polymerase chain reaction* et du séquençage), a brutalement bouleversé les pratiques des laboratoires de pathologie. La nécessité de répondre aux besoins des cliniciens pour une optimisation de l'offre de soins aux patients atteints d'un cancer a entraîné une politique de réflexion nationale, sous l'impulsion de l'Institut national du cancer (INCa), afin de mettre en place de nouvelles procédures dans les laboratoires de pathologie. Ainsi, outre la structuration des plateformes de biologie moléculaire et leur labellisation par l'INCa, le contrôle en amont des étapes présentes entre le prélèvement d'un échantillon tumoral et l'analyse moléculaire, s'est révélé primordial. En effet, la qualité de ce « temps d'amont » ou phase dite « pré-analytique » conditionne la fiabilité des résultats de biologie moléculaire, donc de la stratégie thérapeutique. Nous décrivons ici les principales étapes à contrôler dans la phase pré-analytique. L'optimisation de cette phase pré-analytique au sein du laboratoire de

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : hofman.p@chu-nice.fr (P. Hofman).

KEYWORDS

Molecular biology;
Tissue;
DNA;
RNA;
Fixative;
Frozen specimen

pathologie a pour but de réduire au maximum ou bien de rendre infime le risque d'erreurs des examens de biologie moléculaire. Ces erreurs peuvent en effet conduire à l'obtention de résultats faussement négatifs ou faussement positifs dont les conséquences thérapeutiques peuvent être particulièrement néfastes pour le patient atteint d'un cancer.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary The advent of the targeted cancer therapies administered to patients, according to the results of molecular biology techniques (in particular, *in situ* hybridization, "polymerase chain reaction" amplification and sequencing), has modified the practice of the surgical pathology laboratories. The necessity to answer to the needs of physicians for optimizing the medical care for patients who develop cancer has led to a policy of national debate, spurred by the National Institute of Cancer (INCa), in order to implement new procedures in the pathology laboratories. Thus, in addition to the structuring of molecular biology platforms and their labeling by INCa, the upstream control of the steps present between resection of tumor samples and molecular analysis has proved to be crucial. Indeed, the quality of this upstream time, called "pre-analytical" phase, determines the reliability of the molecular biology results and therefore the therapeutic strategy. We describe here the main steps to be checked in the pre-analytical phase. The optimization of this pre-analytical phase within the surgical pathology laboratory aims to reduce or render insignificant the risk of errors of molecular biology tests. These errors can indeed lead to false negative or false positive results whose therapeutic consequences can be particularly harmful to patients with cancer.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Les examens de biologie moléculaire (BM) réalisés à partir de tumeurs humaines peuvent permettre une optimisation de l'offre de soins aux patients atteints de cancer, grâce à la mise en évidence d'amplification de mutation de gènes ou de réarrangements chromosomiques autorisant une modification de la stratégie thérapeutique. Ainsi, l'étude à l'échelon moléculaire des tumeurs peut permettre une thérapeutique ciblée, donc adaptée à chaque patient (médecine « personnalisée »). Les principaux développements et applications concernent aujourd'hui des thérapeutiques ciblant quelques molécules, en particulier le récepteur de l'EGF, KRAS, Her2, c-Kit. Dans un avenir très proche, il est certain que d'autres molécules mutées, comme p53, ALK, LKB1, BRAF, ou PAX8/PPAR γ , seront la cible potentielle de nouveaux traitements anticancéreux délivrés dans le cadre de l'offre de soins aux patients. Les analyses moléculaires sont possibles sur des coupes tissulaires déparaffinées et sur du matériel cytologique par techniques FISH et CISH. Ces analyses se font également à partir d'acides nucléiques extraits de tissus inclus en paraffine (ADN essentiellement et parfois ARN) et de tissus congelés (ADN et ARN) [1–3]. D'autres molécules, les micro-ARN, peuvent certainement dans l'avenir constituer des cibles prometteuses pour le diagnostic, le pronostic et la stratégie thérapeutique anticancéreuse [4–6]. Fait marquant, ces micro-ARN sont stables après fixation formolée et peuvent être aussi détectés par hybridation *in situ* [7,8].

Plusieurs étapes conditionnent la fiabilité du résultat des examens de BM et donc la décision thérapeutique. Certaines de ces étapes sont déjà bien connues des pathologistes car elles peuvent modifier la qualité des signaux obtenus en immuno-histochimie [9,10]. La qualité des acides nucléiques que l'on va extraire des prélèvements ou que l'on va analyser sur les coupes tissulaires ou les appositions cytologiques est primordiale pour l'obtention de résultats fiables. Il convient aussi de ne pas négliger l'aspect quantitatif, car certains examens de BM peuvent nécessiter l'utilisation d'une quantité plus importante d'acides nucléiques. On

conçoit donc ici l'importance du laboratoire de pathologie dans les différentes étapes de conditionnement d'un tissu et de ses « produits dérivés », depuis la réception d'un échantillon jusqu'à l'analyse moléculaire (Fig. 1). Toutefois, certaines étapes initiales, précédant la fixation ou la congélation, réalisées en dehors du laboratoire, notamment au bloc opératoire, peuvent aussi influencer la qualité d'un échantillon et doivent donc être si possible évaluées.

Nous décrivons dans cette revue les principales étapes clés à contrôler lors de la phase pré-analytique d'un échantillon tissulaire dédié à des examens de BM. Nous développons ici l'approche pré-analytique en pathologie tumorale, en excluant la problématique pouvant se poser dans ce domaine en pathologies inflammatoire et infectieuse [11–15].

Phases pré-analytique, analytique et post-analytique

La phase « pré-analytique » est celle qui conduit un échantillon depuis son prélèvement sur le patient jusqu'aux examens de BM. Cette phase doit être parfaitement contrôlée par les différents acteurs du laboratoire de pathologie (technicien, ingénieur, cadre de santé, secrétaire, pathologiste), en liaison étroite avec les services cliniques (Fig. 1). La phase « analytique » correspond aux examens de BM (en particulier, hybridation *in situ*, séquençage, PCR, qPCR). Cette phase peut être sous la responsabilité d'un pathologiste moléculaire et/ou d'un biologiste moléculaire. Ainsi, ces examens peuvent se faire dans l'enceinte d'un laboratoire de pathologie, à condition d'avoir un secteur dédié et sécurisé, ou bien dans un laboratoire de biologie. La phase « post-analytique » consiste à évaluer les résultats obtenus et à les valider. Cette phase finale, nécessite une confrontation a posteriori des résultats moléculaires et morphologiques. Cette phase post-analytique de validation se fait en présence du pathologiste « morphologique », du pathologiste et/ou du biologiste « moléculaire » et du technicien ou de l'ingénieur, afin de dépister d'éventuelles

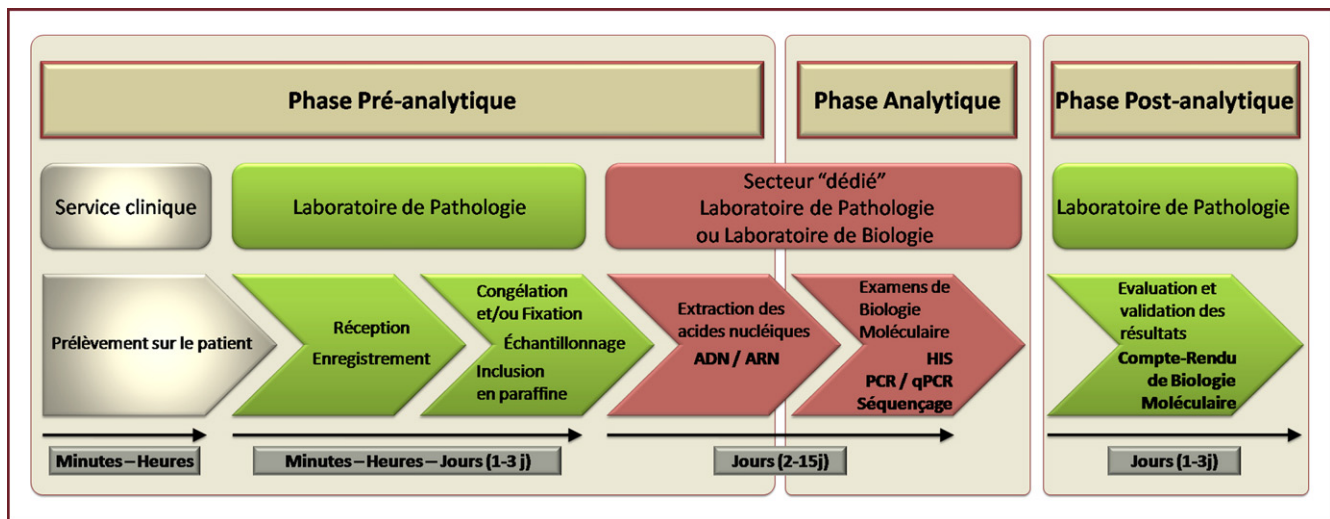


Figure 1. Ensemble des différentes étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.
The different pre-analytical, analytical and post-analytical steps.

discordances de résultats. Il convient alors dans cette phase d'analyser le résultat des tests moléculaires selon, la nature du bloc ou de l'échantillon congelé sélectionné, le pourcentage de cellules tumorales, la qualité et la quantité des acides nucléiques extraits, la présence et l'étendue des zones de nécrose et le contexte clinique. Cette phase post-analytique conduit à la réalisation d'un compte rendu des résultats d'examen de BM, qui sera transmis aux services cliniques et au laboratoire de pathologie ayant adressé le prélèvement. Un point critique est de déterminer le délai conduisant à la transmission de ces résultats. Ce délai est conditionné par plusieurs paramètres :

- la décision initiale de réaliser un examen de BM ;
- la sélection et la transmission du bloc tissulaire ou de l'échantillon congelé au secteur de BM ;
- l'extraction des acides nucléiques et le contrôle de qualité de ces acides nucléiques ;
- la réalisation des techniques de BM ;
- la validation du compte rendu de BM. Ainsi ce délai peut varier selon les cas de quelques jours à trois ou quatre semaines.

Mise en place d'un « secteur pré-analytique » dans un laboratoire de pathologie

Cette démarche entre dans un processus d'assurance qualité d'un laboratoire de pathologie et sera certainement un point très important à négocier pour l'obtention d'une accréditation selon une norme de type ISO 15189. Ce dernier référentiel doit permettre notamment de maîtriser le système de management de la qualité de l'ensemble des différentes étapes mis en place au sein du laboratoire de pathologie. Il repose aussi sur la validation des méthodes et sur le développement d'une métrologie rigoureuse. Il est crucial que les techniciens et ingénieurs du laboratoire de pathologie soient formés à cette nouvelle orientation de leur activité. Cette formation passe par la transmission du savoir-faire entre le personnel qualifié et les nouveaux techniciens puis l'appréciation des compétences acquises avant de permettre une autonomie technique. Cette formation en interne doit être formalisée sous forme de procédures

tracées et de validation par les différents responsables (responsable du secteur technique, responsable qualité et responsable du laboratoire). Cette formation doit passer aussi par des formations externes (par exemple, participation à la formation sur l'extraction des acides nucléiques, participation à des congrès, stages théoriques et pratiques au sein des différentes compagnies commercialisant les extracteurs d'acides nucléiques).

Les différentes étapes de la phase pré-analytique

Étape précédant la fixation ou la congélation

Cette étape peut « échapper » au contrôle du pathologiste, car la gestion du prélèvement commence dès l'intervention chirurgicale. Les paramètres à contrôler concernent les temps d'ischémie chaude et d'ischémie froide (Fig. 2). Le temps d'ischémie chaude correspond au délai entre la ligature artérielle chirurgicale et la résection opératoire. Ce temps peut être apprécié et colligé au bloc opératoire. Il dépend en particulier de la complexité de l'intervention et de la dextérité du chirurgien. Les acides nucléiques (en particulier l'ARN) de certains organes et tissus (ganglion lymphatique, tube digestif, pancréas, poumon) sont plus sensibles à ce temps d'ischémie chaude que d'autres (sein, thyroïde, foie). Le temps d'ischémie froide est le délai entre l'exérèse et la fixation et/ou la congélation (Fig. 2). Ce temps est variable selon la distance existant entre le bloc opératoire et le laboratoire, l'arrivée de la pièce opératoire par un coursier ou directement par un pneumatique. De la même façon, certains tissus sont plus sensibles à ce temps d'ischémie froide (poumon, tube digestif, rein), comparativement à d'autres tissus/organes (thyroïde, cerveau). Ces temps peuvent être appréciés grâce à une fiche de traçabilité mise en place indiquant les heures précises du clampage artériel, de l'exérèse, du départ du bloc opératoire, de l'arrivée dans le laboratoire et de la fixation et/ou de la congélation. Certains procédés ont été développés et sont proposés afin d'essayer de contrôler le temps d'ischémie froide [16]. Ainsi, des systèmes permettant la création de vide d'air peuvent être placés à proximité des

blocs opératoires et les tissus ainsi conditionnés pourraient maintenir leur intégrité en acides nucléiques pendant plusieurs heures [16].

La fixation et la congélation

La grande majorité des échantillons prise en charge par un laboratoire de pathologie sont fixés dans le formaldéhyde à 10%. La fixation dans le liquide de Bouin est maintenant très exceptionnelle, compte tenu de la toxicité de ce dernier et son effet délétère sur les acides nucléiques et certaines protéines. Les avantages de la fixation formolée sont nombreux : maintien d'une excellente morphologie, faible coût, pénétration rapide dans les tissus, reproductibilité des résultats obtenus, immuno-histochimie déjà standardisée pour la plupart des anticorps [17]. Les paramètres à prendre en considération sont relativement nombreux. La concentration et le pH de la solution de fixation doivent être régulièrement contrôlés. La durée de la fixation est très certainement l'étape la plus limitante et la plus difficile à maîtriser. Cette durée peut être très variable pour le même type de prélèvement et d'organe, selon le jour et même l'heure d'arrivée de ce prélèvement dans le laboratoire. Ainsi, une pièce de lobectomie pulmonaire n'aura pas la même durée de fixation selon qu'elle soit réalisée le vendredi après midi, ou la veille d'un jour de congé,

un lundi matin ou bien un lundi après midi, selon qu'elle soit immédiatement injectée de formaldéhyde en intrabronchique ou non. Cette durée de fixation influe sur la qualité des examens de BM obtenus en aval en modifiant la structure des acides nucléiques (ARN, ADN) et des protéines [18]. Ainsi, les résultats des techniques d'immuno-histochimie, mais aussi des techniques de FISH, CISH, de PCR et de western blot sont dépendants en grande partie de ce temps de fixation [19,20]. Il faut essayer d'évaluer une durée maximale au-delà de laquelle on parlera de « surfixation » pouvant donner des résultats faussement négatifs et une durée minimale de fixation pour permettre une déshydratation optimale du tissu [21]. Ainsi, les signaux obtenus avec un anticorps antirécepteur des estrogènes sur des tumeurs mammaires peuvent varier selon la durée de fixation au formaldéhyde [21]. Selon l'organe, cette durée de fixation n'a pas les mêmes conséquences : organes creux ou riches en cavité (tube digestif, poumon), organes pleins (foie, rate, rein). La taille du prélèvement influe aussi sur la fixation, le fixateur pénétrant alors plus ou moins rapidement et profondément [21]. Ainsi pour des tumeurs volumineuses, on peut suggérer de réserver des échantillons tissulaires de 0,5 à 1 cm³ que l'on fixera immédiatement pour les analyses de BM. Des solutions de conservation, comme le « RNAlater® » peuvent préserver, au moins partiellement, la qualité des acides nucléiques, notamment de l'ARN, avant congélation

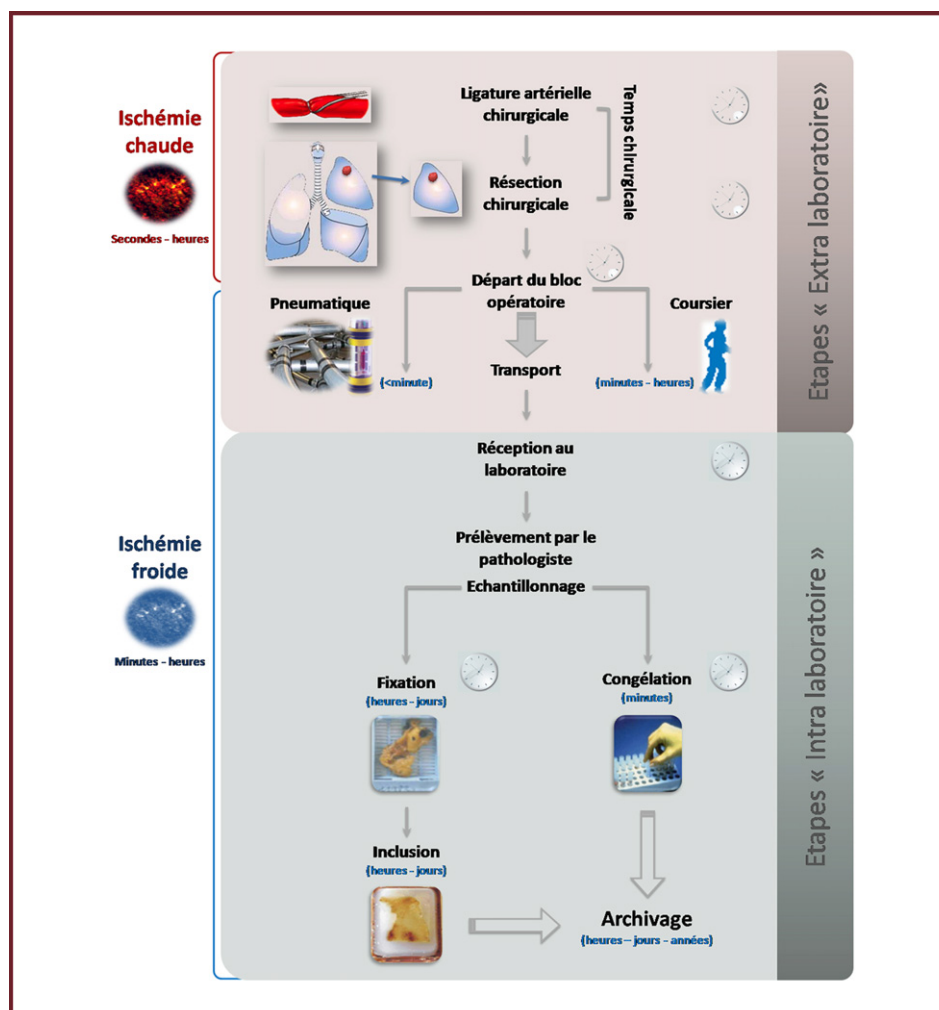


Figure 2. Les différents temps de la phase pré-analytique conditionnant la qualité et la quantité des acides nucléiques tissulaires. The pre-analytical time intervals, which can influence the quantity and quality of tissular nucleic acids.

[22]. Toutefois, cette solution alternative ne conserve pas idéalement la morphologie des tissus, ce qui peut être un facteur limitant pour leur utilisation en anatomopathologie.

Les durées d'ischémies chaude et froide sont importantes à évaluer pour la congélation en azote liquide. En effet, la qualité de l'ARN dépend grandement du délai de congélation et la dégradation des « longs ARN » peut être très rapide (celle-ci est variable selon ce délai et l'organe pris en considération).

Au-delà de la fixation, les étapes d'« enrobage » dans la paraffine et les étapes de « déplissage » des coupes sur les platines chauffantes devraient également être prises en considération dans la phase pré-analytique. Les différentes variations de température que subissent alors les tissus lors de ces étapes contribuent probablement à modifier la structure des acides nucléiques.

Quid des substituts du formaldéhyde et des examens de biologie moléculaire ?

« Un vent de panique » s'est emparé des pathologistes (du moins en France) ces dernières années, suite à la publication de certains décrets et des nombreuses communications sur le sujet, concernant l'effet carcinogène du formaldéhyde (effet très justement confirmé par les travaux de l'IARC) [23,24]. Cela a conduit à adopter une reconsidération rapide des pratiques d'hygiène et de sécurité dans les laboratoires de pathologie avec une sécurisation des enceintes du laboratoire permettant la manipulation du formol, en évitant strictement tout contact avec le personnel technique et médical. La plupart des laboratoires étaient déjà bien adaptés à cette manipulation sécurisée du formol. Certains laboratoires ont pu rapidement modifier leur conformation. Toutefois, un certain nombre de structures d'anatomo-cytopathologie et de pathologistes se sont lancés dans une course effrénée pour trouver le plus vite possible un substitut non toxique au formaldéhyde. « L'acharnement » des différentes structures commerciales disposant déjà ou mettant sur le marché divers substituts (dits malencontreusement pour certains d'entre eux « non toxiques ») a fait que certains laboratoires ont remplacé immédiatement le formol dans leurs pratiques sans trop en évaluer les conséquences, ainsi que leur coût plus important à long terme. Les solutions alternatives à la fixation par le formaldéhyde sont très nombreuses [25–32]. Cependant, les examens de BM (FISH, CISH, PCR) ont été à ce jour essentiellement standardisés sur des tissus fixés par le formaldéhyde, ce qui rend la comparaison avec des résultats obtenus après une fixation dans d'autres fixateurs très difficiles [33–36]. Il est toutefois acquis qu'un certain nombre de ces fixateurs peut améliorer grandement le rendement des résultats de BM obtenus à partir de tissus inclus en paraffine [35,37–40]. En effet, à l'inverse du formaldéhyde, un certain nombre de ces fixateurs préserve correctement les acides nucléiques et un grand nombre de protéines [40]. Cependant, la fixation des tissus dans ces différents substituts du formaldéhyde doit obéir aux règles énoncées plus haut, concernant la durée de fixation. De plus, plusieurs critères sont à considérer pour comparer les différentes solutions proposées (Tableau 1). Des études comparatives coordonnées et rigoureuses, ainsi que des Recommandations nationales formulées et diffusées par la suite d'une façon contrôlée sont très souhaitables.

Tableau 1 Principaux critères d'évaluation d'un fixateur.

Main criteria of evaluation for a fixative.

<i>Toxicité</i>
<i>Coût</i>
<i>Impact sur l'analyse macroscopique</i>
Coloration
Consistance
Pénétration des tissus
<i>Morphologie</i>
Caractéristiques des noyaux et des nucléoles
Cytoplasme et contour cytoplasmique
<i>Histochimie</i>
Coloration standard (hématoxyline éosine safran)
Colorations complémentaires
<i>Immuno-histochimie</i>
Antigènes nucléaires, cytoplasmiques, membranaires
<i>Acides nucléiques</i>
Qualité et quantité d'ADN extrait
Qualité et quantité d'ARN extrait
Qualité et quantité de micro-ARN extrait
<i>Conservation</i>
Après plusieurs années et à température ambiante

L'extraction des acides nucléiques et les contrôles de qualité

Les pratiques habituelles d'un laboratoire de pathologie (coupes réalisées sur le même microtome de différents blocs de paraffine en utilisant un même rasoir sans le changer, lames montées dans un même bain-marie à 37 °C ou sur une même platine, etc.) peuvent entraîner des contaminations tissulaires entre différents échantillons. Cela est donc incompatible avec les techniques d'amplification par PCR et doit conduire à mettre en place un circuit adapté au sein du laboratoire pour gérer les échantillons spécifiquement adressés pour ces analyses moléculaires.

Certains paramètres sont à considérer avant l'extraction des acides nucléiques. À l'étape de la sélection du bloc, la zone à analyser en BM doit répondre à plusieurs critères : absence de territoire nécrotique trop abondant, pourcentage de cellules tumorales suffisant (ce seuil est à moduler par exemple selon la technique utilisée : séquençage, pyroséquençage ou « SNaPshot »). Le pourcentage optimal de cellules tumorales pour augmenter la fiabilité des résultats n'est en fait pas défini avec exactitude et varie selon les études et selon la pathologie concernée. Pour les carcinomes coliques et pulmonaires et leurs métastases, les chances de réduire le taux de faux négatifs augmentent si le pourcentage de cellules tumorales est supérieur à 60 % sur la coupe. En fait, certaines méthodes (en particulier celles utilisant une approche par pyroséquençage ou bien la technique « SNaPshot ») permettent certainement d'optimiser les résultats et de réduire les taux de faux négatifs. Ainsi, un pourcentage de cellules tumorales de 20 % peut aussi être accepté selon la méthode employée. En dessous de ce seuil, les résultats doivent être rendus sous réserve. Il est aussi crucial de sélectionner un bloc tissulaire dont le diagnostic correspond bien à la « prescription moléculaire » (tumeur, type de tumeur, justification de la demande) et de choisir le bloc de tumeur comportant le plus de cellules tumorales. Lors des coupes tissulaires, plusieurs précautions sont donc à respecter :

- utilisation d'un microtome dédié à la BM ;

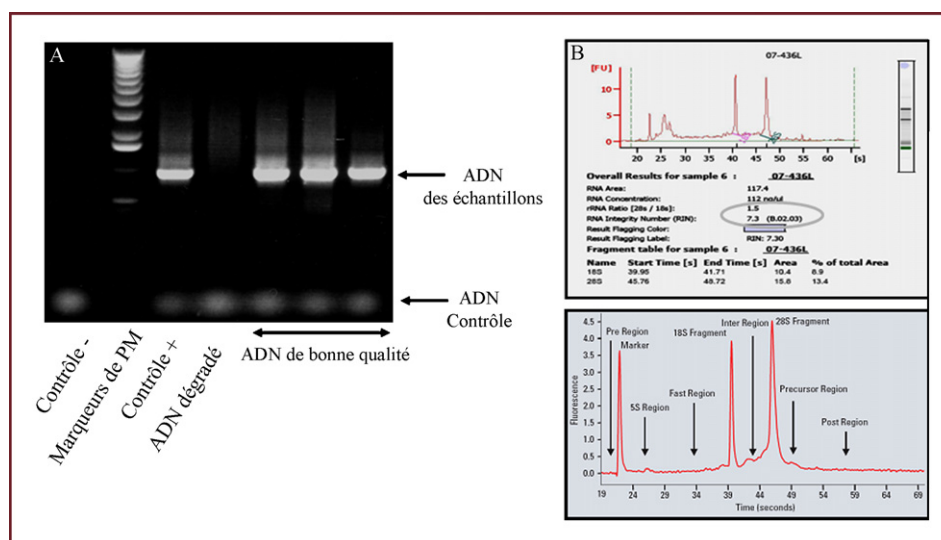


Figure 3. Les contrôles de qualité de l'ADN (A) et de l'ARN (B) extraits. A. Gel d'électrophorèse de différents échantillons d'ADN. B. Profils d'ARN analysés sur un bioanalyseur.
Control of quality for extracted DNA (A) and RNA (B). A. Electrophoresis of different samples of DNA. B. RNA profiles obtained on a bioanalyser.

- nettoyage soigneux à l'alcool du microtome avant et après chaque coupe tissulaire (en associant si possible une solution de DNAase ou de RNAase pour une décontamination) ;
- changement obligatoire du rasoir entre chaque patient ;
- le montage d'une coupe individuellement à l'aide d'un bloc chauffant et si possible déparaffinage et réhydratation des tissus dans des tubes individuels. Enfin, toute mutation détectée doit être confirmée à deux reprises, sur des coupes effectuées de façon totalement indépendante et en utilisant exactement la même méthodologie.

La sélection des territoires tumoraux avant extraction des acides nucléiques est une étape très importante. Cette sélection peut conduire à utiliser soit des coupes entières ou bien des zones disséquées. Des résultats faussement négatifs ou l'obtention d'un important bruit de fond gênant l'interprétation des résultats peut résulter d'un nombre insuffisant de cellules tumorales sur le fragment sélectionné, d'un stroma inflammatoire ou de foyers étendus de nécrose. Cela est particulièrement vrai à partir d'ADN extrait de tissus fixés et serait moins souvent observés à partir d'ADN extrait de tissus congelés dans de bonnes conditions. Il convient aussi de prendre en considération, les variations de sensibilité de détection selon la technique utilisée pour la recherche des mutations (par exemple séquençage classique versus pyroséquençage). Les techniques de dissection permettent d'éliminer les zones non tumorales qui peuvent augmenter le bruit de fond ou masquer des mutations. Il s'agit en général de techniques de macrodissection réalisées sur les coupes déparaffinées. En pratique, sur chaque bloc de paraffine dédié à la BM, il faut faire un HES sur lequel le pathologiste sélectionne la zone tumorale d'intérêt, comportant en particulier le plus de cellules tumorales. Le nombre et l'épaisseur des coupes de paraffine nécessaires pour réaliser une analyse moléculaire à la recherche d'une mutation sont variables d'une étude à une autre. Globalement, on peut considérer qu'il est nécessaire de faire dix coupes de cinq microns pour l'analyse moléculaire après ou sans macrodissection. Ce nombre de coupes peut être plus important sur des fragments biopiques de plus petite taille. Une dernière coupe est ensuite réservée à un nouvel HES afin de s'assurer que le pourcen-

tage de cellules tumorales reste sensiblement identique à celui de la première coupe. Les techniques de microdissection par capture laser sont idéales et permettent au mieux d'optimiser les examens de BM en permettant un enrichissement en cellules tumorales [12,41,42]. Cette méthodologie est particulièrement intéressante pour les fragments biopiques de petite taille [43]. Elle permet d'éliminer la stroma réaction et l'ensemble des territoires non tumoraux. Bien qu'idéale, cette technique est « chronophage » et onéreuse. Elle nécessite aussi un personnel technique qualifié et un dialogue très étroit avec le « pathologiste morphologiste » afin de délimiter les zones d'intérêt. Elle permet un contrôle de qualité des territoires analysés en BM, et un archivage des images numérisées des territoires microdisséqués, avantage majeur pour la traçabilité des événements comparée à la macrodissection. Il est probable que le risque de contamination soit également plus faible, notamment lorsque l'on utilise des capsules « repositionnables ». L'extraction d'ARN peut se faire en parallèle à partir de coupes déparaffinées mais sur des territoires non colorés ou de façon idéale à partir de coupes congelées non colorées si cela est possible.

Compte tenu des délais de fixation et de la qualité des fixateurs variable d'un laboratoire de pathologie à un autre, la qualité des acides nucléiques extraits peut être également très variable (Fig. 3). Pour l'ADN et l'ARN, plusieurs kits commercialisés sont disponibles pour ces extractions. Il faut être sur que ces kits soient bien adaptés pour la détection des fragments d'ADN ou d'ARN de différents poids moléculaire. Les techniques de fixation (à l'inverse de la congélation) peuvent aussi entraîner une fragmentation des acides nucléiques de grande taille et il convient ainsi d'être prudent quant à l'analyse des résultats de BM (notamment lorsque ces résultats sont négatifs). L'extraction des acides nucléiques peut se faire sur des stations automatisées permettant de mieux standardiser les différentes étapes d'extraction. Il convient toujours d'apprécier la qualité des acides nucléiques et la quantité obtenue « pureté », notamment grâce à un spectrophotomètre (de type Nanodrop) qui permettra de doser de faibles quantités d'acides nucléiques. L'utilisation d'un bioanalyseur (type Agilent 2100) permet aussi d'évaluer la qualité des ARN extraits. La qualité

de l'ADN peut être évaluée par PCR et migration sur gel d'électrophorèse de l'ADN extrait. Plusieurs protocoles ont été établis afin d'harmoniser les pratiques des différentes plateformes d'extraction d'acides nucléiques. Au sein de ces protocoles, ceux formulés par l'IARC à Lyon, dans le cadre des projets PNES poumon de l'INCa, sont exemplaires. À titre d'exemple il est fortement recommandé de travailler à partir de 1 µg d'ADN de bonne qualité extrait de tissu inclus en paraffine. Certaines mutations d'origine artéfactuelle ont été rapportées sur de l'ADN extrait à partir de tissus inclus en paraffine, en particulier des mutations de l'EGFR. À l'extrême, si une discordance est observée entre deux prélèvements réalisés pour le même patient et sur des coupes différentes (dans le cadre du contrôle de qualité), les ADN extraits à partir des deux séries de coupes déparaffinées doivent être comparés au niveau de leur séquences microsatellites afin de confirmer ou pas leurs identités génétiques. Enfin, au-delà de la qualité intrinsèque des acides nucléiques, il faut aussi considérer que selon le kit d'extraction, la quantité des acides nucléiques extraits, c'est-à-dire le rendement du niveau d'acides nucléiques extraits, peut être différente [44].

En fonction des temps d'ischémies chaude et froide, du mode et de la durée de la fixation, de la congélation des tissus et du type d'organe, la qualité des acides nucléiques peut donc varier. De cette qualité va dépendre principalement la fiabilité des examens de BM. Au sein d'un tissu l'ARN se dégrade plus rapidement que l'ADN et cette dégradation concerne initialement les ARN de « grande taille » qui se fragmentent. Selon les examens que l'on va réaliser avec l'ARN extrait, l'exigence sur ce degré de qualité est plus ou moins importante. Ainsi, les techniques transcriptomiques (*microarrays*) imposent un ARN de très bonne qualité avec des chiffres de *RNA integrity number* (RIN) élevés (idéalement supérieurs ou égaux à sept) (Fig. 3) [45]. Ces chiffres ne peuvent être obtenus que sur des tissus rapidement congelés après la résection chirurgicale. Un temps extrêmement court d'ischémies chaude et froide est nécessaire si l'on recherche le niveau d'expression de certaines phosphorylations protéiques (par protéomique ou par protéine *arrays*). La qualité des ARN extraits à partir de tissus fixés et inclus en paraffine ne peut être optimale comparativement à celle obtenue à partir de tissus congelés [40,46]. Pour l'ADN, cette qualité est de la même façon très variable et selon la ou les mutations recherchées ou une analyse par *comparative genomic hybridization* (CGH) *array*, les résultats peuvent être faussement négatifs en cas de fragmentation trop importante de la séquence génomique à analyser (Fig. 3A).

L'archivage des tissus et des produits dérivés

Des études antérieures ont montré que l'archivage des blocs tissulaires inclus en paraffine pouvait avec le temps, modifier la qualité de certains signaux détectables, notamment en immuno-histochimie [47]. De la même façon, la qualité des acides nucléiques et des protéines extraits de blocs de paraffine archivés diminue progressivement au fil des années. Cela peut conduire à extraire des acides nucléiques sur des cas sélectionnés en prospectif et à les archiver à basse température de façon à conserver leur intégrité pour des examens ultérieurs. De façon plus minimaliste, il paraît important de conserver les tissus inclus en paraffine dans des pièces climatisées, ne subissant pas de variations de température et si possible à une température inférieure à 20°C. Ainsi, l'interprétation des résultats des analyses moléculaires doit aussi tenir compte de la date de fixation et

d'inclusion en paraffine et des conditions de stockage des blocs de paraffine. Les produits dérivés (ARN, ADN, micro-ARN) doivent être conservés à basse température, au mieux à -80°C pour les ARN. En l'absence d'extraction immédiate, les acides nucléiques des tissus congelés conservés à -80°C se dégradent légèrement mais sont globalement assez bien conservés pendant plusieurs années [48].

Biobanque et recherche translationnelle

Les tissus inclus en paraffine peuvent à un moment ou à un autre être utilisés dans un protocole de recherche clinique. Ainsi, il paraît important à ce jour d'envisager de faire signer un consentement au patient ou du moins d'introduire une note d'information lors de l'hospitalisation signifiant que certains tissus qui seront prélevés et inclus en paraffine pourront être utilisés dans un but sanitaire mais aussi à visée de recherches clinique et translationnelle. Pour les protocoles de recherche, les tissus inclus en paraffine doivent impérativement répondre aux mêmes règles bioéthiques et d'utilisation que les produits tissulaires et biologiques humains congelés et collectionnés dans les tumorothèques et dans les centres de ressources biologiques [49]. On s'oriente ainsi vers la distinction entre les *clinical tissues archives* et les *fresh tissues biobanks* des anglo-saxons. L'utilisation rétrospective d'un grand nombre de tissus inclus en paraffine permet de développer très rapidement des travaux de recherche translationnelle portant sur d'importantes cohortes de patients et de corrélérer les résultats histomoléculaires à l'évolution clinique de ces patients. Toutefois, seule une gestion adaptée des phases pré-analytiques permettra de diminuer l'hétérogénéité des données obtenues et d'autoriser des études comparatives à grande échelle.

Conclusion et perspectives

La phase pré-analytique des examens de BM, phase gérée dans un laboratoire de pathologie, est une étape cruciale à mettre en place, à contrôler et à optimiser. Lors de la rédaction du compte rendu de BM destiné au clinicien, et de façon idéale, les deux niveaux d'information, morphologique et moléculaire, doivent être confrontés. Cela permet la création d'un circuit du travail ou *work flow* optimal pour une décision rapide afin d'adapter la stratégie thérapeutique. Des pièges existent à de nombreux niveaux, depuis le prélèvement jusqu'au contrôle de la qualité et de la quantité d'acides nucléiques extraits. Il nous paraît essentiel d'organiser le laboratoire de pathologie avec un secteur dédié et isolé pour cette nouvelle activité. Ce secteur doit posséder des équipements uniquement réservés à cette activité. La formation du personnel technique et des ingénieurs du laboratoire de pathologie doit donc comporter un module sur la gestion pré-analytique des échantillons. L'ensemble de ces activités a un coût et ne doit pas se faire sans augmentation de temps humain dédié à ce nouveau secteur. Il nous paraît urgent que nos institutions prennent conscience de cette nouvelle activité instaurée dans les laboratoires de pathologie afin de soutenir financièrement cette nouvelle charge de travail imposée par les impératifs des cliniciens, au bénéfice des patients.

Un secteur pré-analytique dédié dans un laboratoire de pathologie devrait conduire à organiser un secteur analy-

tique de BM au sein même de ce laboratoire ou du moins à proximité. Le rôle que le pathologiste joue dans la phase pré-analytique (étape dite de morphologie et de contrôle de qualité des échantillons) est crucial et doit imposer tout naturellement que le pathologiste soit totalement intégré dans la phase analytique et qu'idéalement, ce dernier en acquérant très rapidement une double casquette de compétence devienne ainsi un pathologiste morphologiste et moléculaire.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Références

- [1] Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1929–35.
- [2] Mies C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol* 1994;555–60.
- [3] Votavova H, Forsterova K, Stritesky J, Velenska Z, Trneny M. Optimized protocol for gene expression analysis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 2009;18:176–82.
- [4] Hofman P. Les microARNs : le point de vue du pathologiste en 2007. *Ann Pathol* 2007;27(1):S46–8.
- [5] Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009;27:5848–56.
- [6] Ortholan C, Puissegur MP, Ilie M, Barbry P, Mari B, Hofman P. MicroRNAs and lung cancer: new oncogenes and tumor suppressors, new prognostic factors and potential therapeutic targets. *Curr Med Chem* 2009;16:1047–61.
- [7] Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M. Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *J Clin Pathol* 2009;62:84–8.
- [8] Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 2007;13:1668–74.
- [9] Burford-Mason AP, MacKay AJ, Cummins M, Dardick I. Detection of proliferating cell nuclear antigen in paraffin-embedded specimens is dependent on preembedding tissue handling and fixation. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:1007–13.
- [10] Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000;18:3651–64.
- [11] Cataloluk O, Cakmak EA, Buyukberber N, Barlas O. Formalin fixing and paraffin embedding may lead to extra band development in PCR. *New Microbiol* 2003;26:193–8.
- [12] McKinney MD, Moon SJ, Kulesh DA, Larsen T, Schoepp RJ. Detection of viral RNA from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. *J Clin Virol* 2009;44:39–42.
- [13] Hofman V, Selva E, Landraud L, Sicard D, Vénissac N, Castillo L, et al. P. Value of PCR amplification from formalin-fixed paraffin-embedded tissues in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Ann Pathol* 2003;23:206–15.
- [14] Lassalle S, Selva E, Hofman V, Butori C, Vénissac N, Mouroux J, et al. Sarcoid-like lesions associated with the immune restoration inflammatory syndrome in AIDS: absence of polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in granulomas isolated by laser capture microdissection. *Virchows Arch* 2006;449:689–96.
- [15] Selva E, Hofman V, Berto F, Musso S, Castillo L, Santini J, et al. The value of polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in granulomas isolated by laser capture microdissection. *Pathology* 2004;36:77–81.
- [16] Bussolati G, Chiusa L, Cimino A, D'Armento G. Tissue transfer to pathology labs: under vacuum is the safe alternative to formalin. *Virchows Arch* 2008;452:229–31.
- [17] Plénat F, Montagne K, Weinbrek N, Corby S, Champigneulle J, Antunes L, et al. Conséquence moléculaires de la fixation et utilisation des tissus : l'exemple des acides nucléiques et des protéines. *Ann Pathol* 2006;26:8–21.
- [18] Koshiba M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract* 1993;189:66–72.
- [19] Becker KF, Schott C, Hipp S, Metzger V, Porschewski P, Beck R, et al. Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis. *J Pathol* 2007;211:370–8.
- [20] Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem* 200;84:185–93.
- [21] Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E, Mani A, Hastah F. Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2003;120:86–92.
- [22] Paska C, Bögi K, Szilak L, Tokés A, Szabo E, Sziller I, et al. Effect of formalin, acetone, and RNA later fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real time PCR from paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:234–40.
- [23] <http://www.legifrance.gouv.fr/Article/R231-56-3>. Abrogé par décret n° 2008-244 du 7 mars 2008-art.9 (V).
- [24] IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2006;88:1–478.
- [25] Bostwick DG, al Annouf N, Choi C. Establishment of the formalin-free surgical pathology laboratory Utility of an alcohol-based fixative. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:298–302.
- [26] Nogushi M, Furuya S, Takeuchi T, Hirohashi S. Modified formalin and methanol fixation methods for molecular biological and morphological analyses. *Pathol Int* 1997;47:685–91.
- [27] Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002;161:1961–71.
- [28] Titford ME, Horenstein MG. Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:502–6.
- [29] Umlas J, Tulecke M. The effects of glyoxal fixation on the histological evaluation of breast specimens. *Hum Pathol* 2004;35:1058–62.
- [30] Vincek V, Nassiri M, Nadji M, Morales AR. A tissue fixative that protects macromolecules (DNA RNA, and protein) and histomorphology in clinical samples. *Lab Invest* 2003;83:1427–35.
- [31] Weiss LM, Chen YY. Effects of different fixatives on detection of nucleic acids from paraffin-embedded tissues by in situ hybridization using oligonucleotide probes. *J Histochem Cytochem* 1991;39:1237–42.
- [32] Wiedorn KH, Olert J, Stacy RA. HOPE-a new fixing technique enables preservation and extraction of high molecular weight DNA and RNA of > 20 kb from paraffin-embedded tissues Hepes-Glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect. *Pathol Res Pract* 2002;198:735–40.
- [33] Hofman P. Quels fixateurs ? Pour quelles indications ? Principaux critères d'évaluation des méthodes alternatives à la fixation par le formol. *Rev Fr Lab* 2009;408:45–8.
- [34] Le Guellec S, Lacroix-Triki M, Delord JP, Ben Allal G, Rochaix P. Les nouveaux fixateurs tissulaires. *Rev Fr Lab* 2009;408:425–32.
- [35] Stanta G, Mucelli SP, Petrerà F, Bonin S, Bussolati G. A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteo-

- mic analysis in human archive's tissues. *Diagn Mol Pathol* 2006;15:115–23.
- [36] Willmore-Payne C, Metzger K, Layfield LJ. Effects of fixative and fixation protocols on assessment of Her-2/neu oncogene amplification status by fluorescence in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:84–7.
- [37] Cox ML, Schray CL, Luster CN, Stewart ZS, Korytko PJ, Khan MKN. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp Mol Pathol* 2006;80:183–91.
- [38] Esteban JM, Sheibani K, Owens M, Joyce J, Bailey A, Battifora H. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis: a need for strict internal DNA standards. *Am J Clin Pathol* 1991;95:460–6.
- [39] Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, et al. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am J Pathol* 2002;160:449–57.
- [40] Lassalle S, Gavri-Tanga V, Ilie M, Brest P, Hofman V, Havet K, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid* 2009;19:1239–48.
- [41] Dillon D, Zheng K, Negin B, Costa J. Detection of Ki-ras and p53 mutations by laser capture microdissection/PCR/SSCP. *Methods Mol Biol* 2005;293:57–67.
- [42] Donati V, Lupi C, Ali G, Corsi V, Viti A, Lucchi M, et al. Laser capture microdissection: a tool for the molecular characterization of histologic subtypes of lung adenocarcinoma. *Int J Mol Med* 2009;24:473–9.
- [43] Fuiki T, Ohe Y, Tsuta K, Furuta K, Sakamoto H, Takano T, et al. Prospective study of the accuracy of EGFR mutational analysis by high-resolution melting analysis in small samples obtained from patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:4751–7.
- [44] Madabusi LV, Latham GJ, Andruss BF. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol* 2006;411:1–14.
- [45] Hofman P. DNA microarrays. *Nephron Physiol* 2005;9:85–9.
- [46] Benchekroun M, DeGaw J, Gao J, Sun L, von Bogulawsky K, Leminen A, et al. Impact of fixative on recovery of mRNA from paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:116–25.
- [47] Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ. Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1054–9.
- [48] Jewell SD, Srinivasan M, McCart LM, Williams N, Grizzle WH, LiVolsi V, et al. Analysis of the molecular quality of human tissues: an experience from the Cooperative Human Tissue Network. *Am J Clin Pathol* 2002;118:733–41.
- [49] Hofman V, Selva E, Chabannon C, Bonnetaud C, Gaziello MC, Bordone O, et al. Les biobanques en France: enjeux et contraintes. *Rev Fr Lab* 2010;418:55–9.