



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

RAPPORT D'ÉVALUATION TECHNOLOGIQUE

Conditions pré-analytiques de réalisation de la recherche du génome (ADN) des Papillomavirus Humains (HPV) oncogènes à partir de frottis cervico-utérins

Octobre 2013

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

Haute Autorité de Santé

Service documentation – Information des publics
2, 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	5
Résumé	6
Introduction	7
1. Contexte	8
1.1 Les virus HPV	8
1.2 Cancer du col de l'utérus.....	8
1.3 Recherche des HPV oncogènes par détection d'ADN en cas de frottis ASC-US.....	11
1.4 Conditions actuelles de prise en charge financière de la recherche de l'ADN des HPV oncogènes par l'Assurance Maladie	14
1.5 Éléments de pratique en France	15
2. Problématique et objectifs du travail.....	19
3. Méthode d'évaluation	21
3.1 Recherche documentaire	21
3.2 Position des professionnels de santé.....	22
4. Aspects réglementaires.....	24
4.1 La recherche du génome (ADN) des HPV oncogène à partir de frottis cervico-utérins réalisé dans un laboratoire de biologie médicale.....	24
4.2 La recherche du génome (ADN) des HPV oncogène à partir de FCU réalisé dans une structure d'anatomie et de cytologie pathologiques.....	30
5. Recommandations de bonnes pratiques (RBP) de réalisation de la phase pré-analytique.....	33
5.1 RBP nationales et internationales relatives au prélèvement d'un FCU en vue de la réalisation de l'examen cytologique	33
5.2 RBP relatives aux examens réalisés avec des techniques de biologie moléculaire	36
5.3 Synthèse des six recommandations identifiées	39
6. Analyse des études sélectionnées	41
6.1 Impact de la technique et du site de prélèvement sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV.....	41
6.2 Impact de la nature et de la composition du milieu de transport sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV	47
6.3 Comparaison des prélèvements cervicaux recueillis dans un milieu transport versus écouvillons secs	52
6.4 Impact d'un prélavage par l'acide acétique glacial sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV.....	53
6.5 Impact de la durée de conservation sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV	54
6.6 Impact de la température de conservation et de transport sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV	57
6.7 Libération des acides nucléiques pour le test d'hybridation Hybride Capture II.....	59
6.8 Libération des acides nucléiques en vue d'une détection par PCR	61
6.9 Impact des modifications de conditions PCR.....	64
6.10 Conclusion de l'analyse des études.....	65

7. Synthèse de l'avis des professionnels.....	69
7.1 Identification et traçabilité des prélèvements	69
7.2 Conditions optimales pour la réalisation d'un FCU en phase liquide	70
7.3 Importance de la cellularité des prélèvements.....	70
7.4 Transport et conservation des prélèvements pour les tests HPV.....	70
7.5 Importance de l'assurance qualité	71
7.6 Autres aspects soulevés par les experts lors des auditions	71
8. Conclusion générale.....	75
Références	82
Fiche descriptive	85

Abréviations et acronymes

ACP	Anatomie et cytologie pathologiques, ou anatomocytologiste(s)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFAQAP	Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques
AGC	Atypies des Cellules Glandulaires
AMPLICOR ..	Roche AMPLICOR-HPV Test
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ANAES .	Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé
ANSM ...	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm ...	Acide Ribonucléique messenger
ASC	Atypical Squamous Cell
ASC-H ...	Atypical Squamous Cell cannot exclude HSIL
ASC-US	Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance
BR	Bas Risque
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
CNR	Centre national de référence
DMDIV ..	Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro
ENSP	Ecole nationale de santé publique
FCU	Frottis Cervico-Utérin
FDA	Food and Drug Administration
GBEA	Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale
HAS	Haute Autorité de Santé
HC2	Digene Hybrid Capture-2 High-Risk HPV DNA Test
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i>
HPV BR	HPV bas risque
HPV HR	HPV haut risque
HCSP	Haut Conseil de Santé Publique
HSIL	High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (ou LHG)
ICC	Invasive Cervical Cancer
INVS	Institut National de Veille Sanitaire
IST	Infection Sexuellement Transmissible
LBM	Laboratoire de biologie médicale
LSIL	Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion (ou LBG)
PBS	Phosphate Buffered Saline
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RNAses	Ribonucléases
TMA	Transcription-Mediated Amplification

Résumé

Contexte

En France, le dépistage du cancer du col de l'utérus est fondé sur l'examen cytologique d'un frottis cervico-utérin (FCU) tous les trois ans (entre 25 et 65 ans) après 2 FCU normaux réalisés à un an d'intervalle. Si l'examen cytologique révèle un frottis ASC-US¹ une des 3 possibilités² de conduite à tenir est la recherche qualitative du génome (ADN) des HPV oncogènes. Celle-ci est réalisée à partir d'un frottis en phase liquide, elle se déroule en plusieurs étapes : le prélèvement, le transport et la conservation, la libération de l'ADN et la détection des acides nucléiques.

Le prélèvement est réalisé le plus souvent par un gynécologue, mais également par d'autres professionnels de santé (médecin généraliste, sage-femme, ...). Le FCU peut être prélevé uniquement pour la recherche des HPV ou avoir préalablement servi à la cytologie. La recherche des HPV est réalisée par 2 professions de santé : la biologie médicale et l'anatomie et cytologie pathologiques (ACP) ; chacune de ces 2 professions ayant leur propre encadrement réglementaire. Au niveau matériel, plusieurs milieux de conservation et plusieurs trousse de recherche d'HPV sont commercialisés et utilisés en France. Chaque milieu de conservation n'est en général pas prévu pour être utilisé avec toutes les trousse de détection.

Dans un tel contexte, très multifactoriel, les risques d'erreurs peuvent être multiples. Ainsi l'objectif de ce travail - qui se place dans le cadre de l'indication de la recherche d'HPV oncogènes, recommandée et prise en charge par l'Assurance Maladie (FCU ASC-US) - est :

- d'identifier les facteurs pré-analytiques susceptibles d'altérer les résultats des tests HPV,
- d'établir les conditions de réalisation de la phase pré-analytique des tests HPV.

Méthode

La méthode d'évaluation utilisée dans ce travail est fondée sur l'analyse des textes réglementaires s'appliquant à la phase pré-analytique, sur l'analyse des recommandations de bonne pratique et des études identifiées et sur le recueil de la position des professionnels dans le cadre d'auditions individuelles.

Résultats et conclusions

Les résultats issus des différentes analyses citées ci-dessus et la synthèse de l'avis des professionnels auditionnés renvoient toutes aux mêmes conclusions :

- la coordination et la transmission des informations relatives à toutes les étapes pré-analytiques entre celui qui prélève le FCU (gynécologue, médecin généraliste, sage femme, ...) et celui qui recherche l'HPV (biologiste médical, ACP), quels que soient leurs lieux et leurs modes d'exercice ;
- le respect des règles de bonnes pratiques édictées par le Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA)³, opposable pour les biologistes médicaux et recommandé pour les ACP, en matière d'identification, de conservation et de transport des prélèvements ;
- le respect des procédures techniques de réalisation d'un frottis cervico-vaginal optimal (matériel, technique et site de prélèvement) ;
- le respect des bonnes pratiques de réalisation du test HPV.

¹ ASC-US : atypie des cellules malpighiennes de signification indéterminée (Atypical Squamous Cells of undetermined Significance).

² Recommandations ANAES 2002 : conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal.

³ Lors de la mise en place de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale, le GBEA sera remplacé par la norme NF EN ISO 15189.

Introduction

Les papilloma virus humains (*Human Papilloma Virus - HPV*) sont de petits virus à ADN ayant un tropisme exclusif pour les cellules métaplasiques des jonctions des épithéliums malpighiens et glandulaires. Ils induisent un effet cytopathogène caractéristique avec une transformation des kératinocytes en koïlocytes, responsables de lésions cutanées, orales, laryngées et ano-génitales chez l'homme et la femme. Ces lésions sont généralement bénignes, mais peuvent également être à l'origine de l'apparition de cancers, en particulier du cancer du col de l'utérus chez la femme.

Dans ce dernier cas, les HPV sont transmis par contact sexuel, le plus souvent lors des premiers rapports et l'existence d'une infection persistante par HPV à haut risque oncogène est considérée comme la cause principale du cancer du col de l'utérus. L'histoire naturelle du cancer du col est le plus souvent l'aboutissement d'un processus se déroulant sur plusieurs décennies.

En 2000, en France, il se situait au 8^{ème} rang des cancers de la femme en termes d'incidence et au 5^{ème} rang en termes de mortalité.

La stratégie de prévention du cancer du col associe actuellement en France une prévention primaire par la vaccination des jeunes filles entre 11 et 14 ans et une prévention secondaire par dépistage. Ce dernier est fondé sur l'examen cytologique d'un frottis cervico-utérin (FCU) tous les trois ans, de 25 à 65 ans, après 2 FCU normaux réalisés à un an d'intervalle (1-3).

La recherche qualitative du génome (ADN) des HPV oncogènes est l'une des 3 possibilités de conduite à tenir recommandées par l'ANAES devant un FCU ASC-US, c'est-à-dire présentant une atypie des cellules malpighiennes de signification indéterminée (*Atypical squamous cells of undetermined significance*) (3). C'est dans cette indication que la recherche de l'ADN de l'HPV est prise en charge par l'Assurance Maladie (4,5).

La recherche du génome des HPV oncogènes se déroule en plusieurs étapes :

- le prélèvement ;
- le transport et la conservation ;
- la libération de l'ADN ;
- et la détection des acides nucléiques.

D'autres techniques de détection des HPV existent, il s'agit notamment de la recherche des ARNm viraux ou la détection de la protéine cellulaire p 16. Ces deux techniques ne sont actuellement ni préconisées dans les Recommandations françaises, ni prises en charge par l'Assurance Maladie.

En 2009, le Centre national de référence (CNR) des papillomavirus humains a réalisé une enquête (6), auprès de laboratoires pratiquant des examens de détection des HPV. Cette enquête a montré que près de la moitié d'entre eux pratiquaient la recherche des HPV dans des conditions qui n'étaient pas conformes au Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA) (7).

Ces non-conformités concernent notamment la phase pré-analytique, en particulier les liquides de transport cellulaire. En effet, ceux-ci - liquides « maison » sans marquage CE ou liquides avec un marquage CE - n'avaient pas été validés pour la trousse (ou les trousse) de recherche de l'ADN/génome des HPV utilisées par les laboratoires (6).

Suite à ces travaux, le CNR a demandé à la HAS une évaluation des conditions pré-analytiques de détection de l'HPV. Cette demande a été acceptée par la HAS qui a inscrit ce sujet à son programme de travail.

1. Contexte

Ce chapitre de contexte a été rédigé à partir d'une revue non systématique de la littérature ayant inclus des revues générales, des revues systématiques, des rapports d'évaluation, des recommandations et des ouvrages didactiques.

1.1 Les virus HPV

Les HPV sont de petits virus nus, constitués d'une capsidie icosaédrique de 55 nm de diamètre et d'un ADN bicaténaire et circulaire de 8000 paires de bases. Ils appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. Ils sont classés en types et sous-types, basés sur le degré d'homologie des séquences nucléotidiques. Cent quatre vingt neuf génotypes d'HPV ont été caractérisés à l'heure actuelle dont 120 sont susceptibles d'infecter l'homme. Parmi ceux-ci, 40 ont un tropisme spécifiquement génital (8).

Les HPV ont un tropisme exclusif pour les cellules métaplasiques des jonctions des épithéliums malpighiens et glandulaires et induisent un effet cytopathogène caractéristique avec transformation des kératinocytes en koïlocytes. Ils sont responsables de lésions généralement bénignes mais peuvent être à l'origine de l'apparition de cancers. Cette capacité de certains types d'HPV à induire des cancers est liée à l'expression de deux gènes précoces, E6 et E7, dont les produits sont capables de se lier aux protéines p53 et pRB dites « suppresseur de tumeurs ». L'expression de ces gènes est nécessaire au déclenchement du cancer. Dans les néoplasies intra-épithéliales induites par les HPV oncogènes, l'ADN viral est intégré dans les noyaux des kératinocytes transformés et la réplication virale est très faible (9).

Les HPV sont classés en 2 types : alpha et bêta. Au sein des HPV alpha, 4 groupes rassemblant plusieurs types d'HPV ont été différenciés (classification d'après IARC Monograph Working Group, 2009) (10) :

- groupe 1 (oncogènes) : HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 et 59 ;
- groupe 2A (probablement oncogènes) : HPV 68 ;
- groupe 2B (possiblement oncogènes) : HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 30, 34, 69, 85, 97 ;
- groupe 3 (non classables comme oncogènes) : HPV 6 et 11.

Parmi les HPV bêta on retrouve 2 groupes rassemblant également plusieurs types d'HPV :

- groupe 2B (possiblement oncogènes) : HPV 5 et 8 ;
- groupe 3 (non classables comme oncogènes) : qui comprennent d'autres HPV.

1.2 Cancer du col de l'utérus

1.2.1 Histoire naturelle

Une infection persistante par HPV à haut risque oncogène est considérée comme la cause principale du cancer du col de l'utérus. Ce virus est transmis par contact sexuel, le plus souvent lors des premiers rapports (11).

Les infections par HPV sont communes tout au long de la vie adulte chez les femmes sexuellement actives, mais disparaissent le plus souvent spontanément, sans signe clinique. La clairance virale est importante : la moitié des nouvelles infections à HPV sont indétectables en 6 à 12 mois et plus de 90 % à 3 ans (12,13). Une infection persistante est retrouvée chez 3 à 10 % des femmes infectées.

La classification anatomopathologique des cancers invasifs distingue trois types : les carcinomes épidermoïdes qui représentent 80 à 95 % des tumeurs malignes du col, les adénocarcinomes et les tumeurs rares (sarcomes, mélanomes, autres cancers) (14).

Le carcinome épidermoïde du col utérin est généralement l'aboutissement d'un processus se déroulant sur plusieurs décennies, sous l'effet de la persistance de l'infection virale, qui débute par des lésions de bas grade (CIN1 : Cervical Intraepithelial Neoplasia ou LSIL : low grade squamous intraepithelial lesion). L'histoire naturelle du carcinome épidermoïde est habituellement décrite comme comprenant différents stades de transformation de l'épithélium malpighien en lésions néoplasiques intra-épithéliales (Cervical intra-epithelial neoplasia ou CIN) classées en trois grades 1, 2 et 3 (CIN1, CIN2 et CIN3) selon la hauteur de l'atteinte de l'épithélium (14). Bien que la clairance virale soit fréquente au stade CIN1 et que plus de la moitié de ces lésions régressent, l'infection qui persiste peut entraîner une évolution vers des lésions plus sévères (CIN2-3 ou HSIL : high grade squamous intraepithelial lesion) et vers les carcinomes *in situ*. Elles risquent d'évoluer vers le cancer invasif, si elles ne sont pas traitées, mais peuvent aussi régresser (14).

Selon certains auteurs, les lésions de bas grade (LSIL ou CIN1) seraient des manifestations non évolutives de l'infection à HPV et les lésions plus sévères (HSIL ou CIN2-3) seraient des lésions précancéreuses de novo causées par une infection par des HPV à haut risque (15). Il semble qu'au moins une partie des CIN2-3 ne se développe pas à partir des CIN1, mais s'établisse de novo, suite à une infection HPV. Il est donc possible que les CIN1 et les CIN3 soient des manifestations distinctes d'infection avec des types différents d'HPV. Une autre possibilité serait que les CIN1 et les CIN2-3 soient des lésions concomitantes mais avec des localisations et des caractéristiques de croissance différentes et, par conséquent, avec une probabilité différente de détection en cytologie (15).

L'étude française EDITH a analysé la distribution des génotypes HPV responsables de cancers invasifs du col de l'utérus et de lésions de grade intermédiaire et de haut grade (CIN2-3). La proportion de cancers invasifs du col de l'utérus attribuables aux génotypes HPV les plus fréquents (16 et 18) variait de 71 % à 81,8 %. Les huit HPV les plus fréquemment responsables d'un cancer invasif du col de l'utérus en France étaient par ordre de fréquence les HPV 16, 18, 31, 33, 68, 45, 52, 58 (16,17).

Dans une méta-analyse réalisée sur 85 études (publiées jusqu'en février 2002) compilant 10 058 cas de cancer, l'HPV 16 a été identifié dans 55 % des carcinomes malpighiens et 31 % des adénocarcinomes. L'HPV 18 était plus fréquemment isolé dans les adénocarcinomes (37,7 %) que dans les carcinomes malpighiens (12,3 %) (18).

1.2.2 Épidémiologie

En Amérique du Nord et en Europe, 70 % des cancers du col sont associés à l'HPV 16, les autres types les plus fréquents étant les HPV 18, 31 et 45. Selon les études, l'HPV a été retrouvé dans 93 à 99,7 % des cancers (14).

En France, chez la femme, ce cancer est le dixième par sa fréquence (3 068 cas estimés pour l'année 2005) et le quinzième cancer le plus meurtrier avec 1 067 décès estimés pour l'année 2005 (2).

La répartition par âge de l'incidence des cancers invasifs indique une fréquence croissante à partir de 20 ans, jusque vers 40-44 ans (20 cas pour 100 000), suivie d'une diminution jusqu'à 50 ans, puis d'une stabilisation jusqu'aux âges les plus élevés (17 cas pour 100 000). L'âge moyen du diagnostic est de 51 ans. La mortalité par cancer du col est très faible chez les femmes de moins de 30 ans, elle augmente ensuite régulièrement et atteint 15 décès pour 100 000 chez la femme de 85 ans et plus.

Cependant, l'épidémiologie de ces cancers évolue et le risque cumulé de développer un cancer du col de l'utérus avant 74 ans a considérablement diminué avec l'année de naissance : 3,6 % chez les femmes nées en 1910 et 0,6 % chez les femmes nées en 1950 (19,20).

1.2.3 Stratégie de prévention

► Prévention primaire : la vaccination

La vaccination anti-HPV s'inscrit dans le cadre d'une démarche de prévention primaire. Deux vaccins ont une autorisation de mise sur le marché en France : CERVARIX® dirigé contre les HPV 16 et 18 et GARDASIL® dirigé contre les HPV 6, 11, 16 et 18. Le Haut Conseil de Santé Publique recommande que la vaccination des jeunes filles contre le papillomavirus puisse être pratiquée entre les âges de 11 et 14 ans (1). Le HCSP recommande également que l'âge de rattrapage soit limité à 20 ans (i.e. 19 ans révolus), cette vaccination étant d'autant plus efficace que les jeunes filles n'ont pas encore été exposées au risque de l'infection HPV.

► Prévention secondaire : le dépistage

Les recommandations actuelles de dépistage se fondent sur l'examen cytologique d'un frottis cervico-utérin (FCU) à un rythme triennal entre 25 et 65 ans, après 2 FCU normaux réalisés à un an d'intervalle chez les femmes asymptomatiques ayant ou ayant eu une activité sexuelle (2,3). La répétition des FCU se justifie par le manque de sensibilité d'un seul examen (63 % dans l'étude de Fahey *et al.*) et l'évolution lente et fluctuante de la maladie (12,21). Une mise en œuvre du test de détection des HPV à la place de l'examen cytologique a été estimée prématurée en France (2).

► Conduite diagnostique devant un FCU anormal

L'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (ANAES) a émis en 2002 les recommandations suivantes (3) :

Concernant l'interprétation d'un frottis du col de l'utérus

Le système de Bethesda 2001 est le seul recommandé pour formuler le compte rendu cytologique. Il s'applique quelle que soit la technique du frottis.

Sur la conduite à tenir suivante en cas de frottis anormaux

- **Frottis ASC-H** (avec atypies des cellules malpighiennes, ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade). Il correspond dans 40 % des cas à une lésion histologique de type CIN2 ou 3, exceptionnellement à un cancer invasif (ICC : *Invasive Cervical cancer*). Dans ce cas, une colposcopie est recommandée d'emblée.
- **Frottis ASC-US** (*Atypical squamous cells of undetermined significance*), c'est-à-dire avec des atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée. Il correspond dans 5 à 10 % des cas à une lésion histologique de type CIN2 ou 3, exceptionnellement à un ICC. En cas de frottis ASC-US, 3 options sont recommandées pour le clinicien :
 - ▶ une colposcopie d'emblée,
 - ▶ un FCU de contrôle 6 mois plus tard (si au cours de ce frottis de contrôle les anomalies cytologiques ont disparu, une surveillance régulière est justifiée, nécessitant 2 frottis normaux à des intervalles de 12 mois, en raison du risque d'apparition secondaire d'un cancer ; si au cours de cette surveillance des anomalies cytologiques réapparaissent, une colposcopie est impérative, quels que soient leur sévérité et leur délai d'apparition),
 - ▶ **une recherche d'HPV potentiellement oncogènes** :
 - si le résultat de cette recherche est positif, une colposcopie est préconisée,
 - si le résultat est négatif, une cytologie à un an est préconisée.
- **Frottis LSIL** (avec atypies lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade), La recherche d'HPV potentiellement oncogènes n'est pas recommandée en première intention car elle est dans plus de 80 % des cas positive, 2 options sont alors possibles :
 - ▶ une colposcopie,
 - ▶ un FCU de contrôle à 4-6 mois.
- **Frottis HSIL** (avec atypies lésions malpighiennes intra-épithéliales de haut grade). Dans ce cas, une colposcopie est recommandée d'emblée (grade B). Lorsque la colposcopie ne permet

pas d'observer l'intégralité des lésions cervicales, une exérèse à visée diagnostique est recommandée chez ces patientes considérées à haut risque.

- **Frottis avec anomalie des cellules glandulaires** : Quelles que soient les anomalies des cellules glandulaires, une coloscopie avec biopsie dirigée et/ou curetage de l'endocol est recommandé.

1.3 Recherche des HPV oncogènes par détection d'ADN en cas de frottis ASC-US

En France, la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir d'un FCU est réalisée par des laboratoires de biologie médicale, habituellement sous la responsabilité d'un biologiste médical, ou dans une structure d'anatomie et de cytologie pathologiques (ACP), habituellement sous la responsabilité d'un médecin spécialisé en ACP.

La recherche des HPV oncogènes par détection d'ADN est préconisée, après examen cytologique révélant un frottis avec atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée (ASC-US) (3).

Le frottis est réalisé par un professionnel de santé (gynécologue, médecin généraliste ou sage-femme, ...) et transmis à la structure d'ACP pour l'examen cytologique. Deux types de frottis existent :

- le prélèvement est soit étalé sur une lame pour une cytologie conventionnelle (dite de Papanicolaou),
- le prélèvement est déchargé dans un liquide pour une cytologie en phase liquide ou en couche mince, **seul le frottis en phase liquide est utilisé pour le test HPV.**

1.3.1 Les différents circuits possibles d'un FCU destiné à la recherche des HPV oncogènes

Compte tenu de la réalisation du FCU par plusieurs professions de santé, de l'indication recommandée de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes, de l'existence de deux types de FCU et de la réalisation de cette recherche par deux professions de santé, il existe sur le terrain différentes organisations qui font que le FCU en phase liquide destiné à la recherche des HPV oncogènes peut emprunter plusieurs circuits avant la réalisation de celle-ci.

Ainsi, si le FCU est réalisé :

- en première intention pour la cytologie et le cas échéant pour la détection d'HPV, il est déchargé dans un milieu de transport qui convient à la cytologie et à la recherche d'HPV et envoyé du cabinet du préleveur vers la structure d'ACP qui va réaliser la cytologie. En cas de frottis ASC-US et de décision du clinicien de rechercher les HPV oncogènes, ce même FCU pourra soit :
 - ▶ rester dans la structure d'ACP,
 - ▶ être à nouveau envoyé dans une autre structure (de biologie médicale ou d'ACP), afin de réaliser la recherche des HPV oncogènes,
- uniquement pour la détection d'HPV, le frottis est déchargé dans un milieu conforme à la recherche d'HPV, il est envoyé directement du cabinet du préleveur à la structure qui va réaliser cette recherche (biologie médicale ou ACP).

1.3.2 Techniques de détection de l'ADN des HPV oncogènes

La détection de l'ADN des HPV oncogènes repose principalement sur deux techniques, l'hybridation et l'amplification :

▶ Hybridation en phase liquide

L'hybridation en phase liquide repose sur la formation d'hybrides ADN/ARN capturés sur des microplaques recouvertes d'anticorps spécifiques. Une amplification du signal est ensuite réalisée

à l'aide d'anticorps couplés à la phosphatase alcaline. La détection de la réaction est effectuée par chemiluminescence. C'est la technique utilisée par le test Hybrid Capture II test HPV (HCII) (Digene Corporation, Gaithersburg, MD) qui peut détecter 18 génotypes d'HPV à l'aide de deux sondes pour cocktails de génotypes HPV à haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) et à faible risque (6, 11, 42, 43 et 44). Cette technique permet de détecter environ 1 pg/mL d'ADN d'HPV soit environ 5 000 copies/mL, quantifiées en RLU (relative light unit) supérieure ou égale à la valeur seuil calculée à partir de standards présents à chaque série. Une valeur inférieure au seuil est considérée négative. Des contrôles positifs et négatifs sont incorporés à chaque série. Le rendu des résultats est qualitatif.

► Amplification génomique par PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée puis une élongation grâce à l'action de l'ADN Polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. La grande diversité des HPV a conduit à l'utilisation d'amorces à large spectre permettant l'amplification de nombreux génotypes du virus. Ces amorces ont été choisies dans les régions les plus conservées entre les différents types d'HPV, au niveau des gènes E1, E6 (région régulatrice non codante) et L1 (région tardive codant pour les protéines de la capsid).

Toute PCR doit idéalement comporter l'amplification de 3 types de contrôles :

- un contrôle positif qui, consiste en un gène ubiquitaire⁴, tel que la β -actine qui permet de tester la qualité de l'échantillon et de confirmer l'efficacité de la PCR puisque l'agent cible et l'ADN intrinsèque sont détectés simultanément ;
- un contrôle négatif qui vérifie l'absence de contamination ;
- un gène dit « de ménage », correspondant à un élément constitutif des cellules, qui atteste de la qualité de l'échantillon (cellularité suffisante) et de l'efficacité de la procédure d'extraction et d'amplification de l'échantillon. L'absence d'inhibition de la PCR est en partie validée par la PCR du gène de ménage, mais en présence d'une grande quantité de cellules, cette PCR peut être positive alors qu'il existe une inhibition partielle de la cible. L'idéal est d'ajouter à l'échantillon, dans le tampon de lyse avant l'extraction et l'amplification, un standard interne (par exemple une matrice d'ADN synthétique en quantité connue), ce qui permet de vérifier de façon plus sensible l'absence d'inhibiteur.

⁴ Retrouvé dans tous les types cellulaires et chez toutes les espèces.

Remarque : Concernant les tests de détection d'HPV recommandés, en 2002 l'ANAES avait circonscrit son évaluation à la PCR et à l'*Hybrid Capture® 2*. L'évaluation des performances diagnostiques de ces deux techniques de capture d'hybride et de la PCR avait conclu, dans le cadre du dépistage des lésions de haut grade, à une sensibilité variant de 73,8 % à 96,4 % pour la PCR et de 86 à 100 % pour *Hybrid Capture® 2* et à une spécificité équivalente pour les deux tests avec toutefois une variation de 40 à 90 % selon les populations. Le taux de concordance calculé dans une étude portant sur 566 femmes était de 89 % (3,14).

Ainsi ces recommandations précisent que :

- « La PCR (amplification en chaîne par la polymérase) et la capture d'hybrides sont actuellement les meilleures techniques pour détecter l'ADN des HPV génitaux »
- Le résultat de la recherche des HPV oncogènes est un résultat qualitatif décrivant uniquement la présence ou l'absence d'HPV.

Il existe aujourd'hui d'autres techniques permettant de rechercher l'expression des HPV oncogènes via la recherche des transcrits d'ARN viraux ou la détection de la protéine p16 ou encore des techniques avec des seuils de détection plus bas et réalisant uniquement le génotypage des HPV.

Ces techniques ne sont, à ce jour, pas préconisées par les recommandations en vigueur en France et ne sont pas prises en charge par l'Assurance Maladie.

En France, sont commercialisées d'une part plusieurs trousse de détection utilisant l'une ou l'autre des deux techniques décrites ci-dessus et d'autre part plusieurs milieux de conservation. Tous ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV) ont un marquage CE au titre de la directive européenne 98/79/CE relative à ces dispositifs.

Chaque fabricant de trousse de détection valide un ou plusieurs milieux de conservation qu'il préconise avec sa technique, comme prévu dans cette même directive.

En juillet 2013, le CNR des papillomavirus humains a identifié les principaux milieux de conservation validés dans les notices des trousse de détection et de génotypage des HPV (cf. annexe 4). Ce tableau précise également les conditions de conservation après prélèvement.

1.4 Conditions actuelles de prise en charge financière de la recherche de l'ADN des HPV oncogènes par l'Assurance Maladie

Conformément aux recommandations de l'ANAES de 2002 (3), l'Assurance Maladie prend en charge la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes en cas de FCU ASC-US. Cet acte est en effet inscrit :

- à la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) pour les biologistes médicaux, et pour les ACP exerçant dans un laboratoire de biologie médicale (4) ;
- à la Classification commune des actes médicaux (CCAM) pour les ACP travaillant dans une structure d'ACP (5,22)⁵.

Les codes et libellés sont les suivants :

► CODE CCAM : ZZQP173

Libellé : Test de détection du génome des papillomavirus humains oncogènes :

- *Notes : Indication* → selon les recommandations de bonnes pratiques Anaes 2002 (frottis ASC-US).
- *Formation : spécifique* → formation à la biologie moléculaire.
- *Environnement : spécifique* → à réaliser dans les mêmes conditions que celles des laboratoires d'analyse de biologie médicale.

► CODE NABM : 4127

Désignation : Papillomavirus humains oncogènes (HPV) génome viral

- *Pour les papillomavirus humains (HPV) oncogènes : Détection du génome viral (ADN). Par hybridation moléculaire, avec ou sans amplification génique sur cellules de frottis cervico-utérin. Une seule cotation par patient.*
- *L'indication du test est limitée à la situation suivante : frottis avec atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée (ASC-US).*
- *Le compte-rendu devra préciser, outre le nom de la trousse utilisée, le mode de prélèvement, la description des génotypes recherchés, la valeur seuil de la technique, la localisation du prélèvement, le résultat cytologique, le traitement chirurgical éventuel, le résultat positif ou négatif du prélèvement testé (présence ou absence d'ADN d'HPV) et si possible les résultats des précédentes analyses.*

► CODE NABM : 0024

- **Désignation :** HPV : détection du génome (ADN) des papillomavirus humains oncogènes.
- Le code 0024 de la NABM est destiné aux ACP exerçant dans un laboratoire de biologie médicale.

⁵ L'inscription à la CCAM (mai 2010) avait été précédée par une inscription à la Nomenclature générale des actes professionnels (NGAP) (octobre 2009).

1.5 Éléments de pratique en France

1.5.1 Données de l'Assurance Maladie sur le nombre de cytologies et de recherche des HPV oncogènes remboursés de 2010 à 2012

Ces données sont présentées dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 1. Nombre de cytologies.

	2010		2011		2012	
	N (en millions)	%	N (en millions)	%	N (en milliers)	%
Structures ACP ¹	5,28	88,4	5,22	88,1	4,85	87,6
LBM ^{2,3}	0,69	11,6	0,71	11,9	0,69	12,4
Total	5,97		5,93		5,53	

Sources : Risques maladie + maternité + accidents du travail - maladies professionnelles

1 : actes tarifés en NGAP et en CCAM (DCIR, données en dates de liquidation, extrapolées à l'ensemble des régimes, actes réalisés en cabinet / établissements de santé).

2 : actes tarifés en NABM (DCIR, données Biolam RG hors SLM et hors DOM, extrapolées à l'ensemble des régimes et régions, actes réalisés en laboratoires de biologie médicale).

3 : les ACP qui exercent dans des laboratoires de biologie médicale cotent leurs actes en NABM.

Tableau 2. Nombre de cytologies réalisées sur frottis conventionnel et sur frottis en phase liquide^{1,2}.

	2010		2011		2012	
	N (en millions)	%	N (en millions)	%	N (en millions)	%
Frottis conventionnels	0,77	56	2,61	52	2,28	47
Frottis en phase liquide	0,61	44	2,44	48	2,55	53
Total	1,39		5,05		4,83	

Sources : Risques maladie + maternité + accidents du travail - maladies professionnelles.

1 : Cette distinction n'est connue que pour une partie seulement des cytologies : celles cotées en CCAM (pas de distinction pour la NABM, ni pour la NGAP qui a été remplacée par la CCAM en mai 2010), soit 23 % en 2010, 85 % en 2011 et 87 % en 2012.

2 : actes tarifés en NGAP et en CCAM (DCIR, données en dates de liquidation, extrapolées à l'ensemble des régimes, actes réalisés en cabinet / établissements de santé).

Tableau 3. Nombre de recherches du génome (ADN) des HPV oncogènes.

	2010		2011		2012	
	N (en milliers)	%	N (en milliers)	%	N (en milliers)	%
Structures ACP ^{1,2}	23,6	21,7	52,2	41,9	62,8	49,6
LBM ³	85,1	78,3	72,3	58,1	63,8	50,4
Total	109		125		127	

Sources : Risques maladie + maternité + accidents du travail - maladies professionnelles

1 : actes tarifés en NGAP et en CCAM (DCIR, données en dates de liquidation, extrapolées à l'ensemble des régimes, actes réalisés en cabinet / établissements de santé)

2 : l'année 2010 est la première année complète de cotation de cet acte par les ACP (inscription à la NGAP en octobre 2009)

3 : actes tarifés en NABM (DCIR, données Biolam RG hors SLM et hors DOM, extrapolées à l'ensemble des régimes et régions, actes réalisés en laboratoires de biologie médicale)

Tableau 4. Pourcentage de recherches d'HPV par rapport au nombre de cytologies.

2010	2011	2012
1,8	2,1	2,3

Sources : Risques maladie + maternité + accidents du travail - maladies professionnelles.

Actes tarifés en NGAP et en CCAM : DCIR, données en dates de liquidation, extrapolées à l'ensemble des régimes, actes réalisés en cabinet / établissements de santé.

Actes tarifés en NABM : DCIR, données Biolam RG hors SLM et hors DOM, extrapolées à l'ensemble des régimes et régions, actes réalisés en laboratoires de biologie médicale.

Concernant la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes, on peut remarquer qu'elle représente environ 2 % des examens cytologiques, ce qui est cohérent avec le taux de FCU ASC-US rapporté dans la littérature (23) et cité par les experts auditionnés (cf. annexe 8).

Le nombre de recherche d'HPV a augmenté de 14,5 % entre 2010 et 2011 mais 2010 est la première année entière durant laquelle les ACP pouvaient coter cet acte ; cette augmentation pourrait donc refléter « une montée en charge » de cette profession. Il y a peu de différence entre 2011 et 2012 (1,6 %).

En 2012, la recherche d'HPV se répartit de façon quasi équivalente entre les biologistes médicaux et les ACP alors qu'en 2011, la répartition était de 42 % pour les ACP et 58 % pour les biologistes médicaux.

Concernant la cytologie, on note une inversion des pourcentages de frottis conventionnels et de frottis en phase liquide entre 2011 et 2012 : les frottis en phase liquide passent de 48 à 53 %. Les chiffres de l'année 2010 sont à prendre avec plus de circonspection car la distinction entre frottis conventionnel et frottis en phase liquide n'est connue que pour un quart environ des cytologies.

1.5.2 Enquête réalisée par le centre de référence national (CNR) des HPV de février à juillet 2009

Cette enquête (6), réalisée auprès de 35 laboratoires de biologie médicale publics ou privés avec une activité importante dans la détection des HPV, avait pour but d'obtenir une description de l'activité de ces laboratoires dans ce domaine.

Seuls seront reportés ici les éléments qui intéressent ce travail, à savoir les constats relatifs à l'absence de conformité des milieux de transport cellulaire avec les trousse de détection et/ou de génotypage des HPV.

Il est entendu par « conformité » que chaque trousse soit utilisée avec le(s) milieu(x) de transport préconisé(s) par le fabricant ou le cas échéant avec un milieu pour lequel une étude de validation a été réalisée en interne par la structure réalisant la recherche de l'HPV.

Cette enquête a montré que parmi les laboratoires auprès desquels a été étudiée la conformité des milieux de transport/conservation cellulaire :

- 49 % (16 laboratoires) analysaient des prélèvements recueillis dans des milieux ayant un marquage CE pour la cytologie et/ou pour la virologie. Cependant parmi ces laboratoires, cinq acceptaient plusieurs milieux et utilisaient par ailleurs plusieurs trousse de génotypage, ce qui ne permettait pas de savoir précisément si tous les prélèvements étaient réalisés dans des conditions conformes ;
- 3 laboratoires recevaient des milieux de transport avec un marquage CE mais utilisaient des trousse de détection non validées avec ces milieux ;
- 6 laboratoires recevaient les prélèvements dans des liquides de transport sans marquage CE et non validés avec les trousse de détection et/ou génotypage qu'ils utilisaient ;

- 8 laboratoires qui pratiquaient le génotypage de l'HPV recevaient des prélèvements dans des milieux autres que le liquide validé par le fabricant pour la technique de génotypage utilisée.

Cette enquête (6) a conclu que plus de la moitié des laboratoires pratiquaient la détection des HPV oncogènes dans des conditions qui ne sont pas conformes au Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA) (7,24). Ces non-conformités concernent la phase pré-analytique, en particulier l'utilisation des liquides de transport cellulaire non validés pour les trousse de détection et/ou de génotypage utilisées, qu'ils soient « maison » ou avec un marquage CE.

1.5.3 Étude des conditions pré-analytiques de réalisation des tests

Le CNR HPV et l'ANSM⁶ anciennement Afssaps⁷ ont conduit en commun une opération de Contrôle National de Qualité (CNQ) des examens de recherche du génome viral de papillomavirus (HPV) au cours du dernier trimestre de l'année 2011 (14/11/11 au 12/12/2011). Ce contrôle a été réalisé auprès de 74 structures pratiquant la détection et/ou génotypage de l'HPV (64 laboratoires de biologie médicale et 10 cabinets d'anatomocytologie).

Dans le cadre de ce contrôle de qualité externe, une étude dont l'objectif était de décrire les conditions pré-analytiques de réalisation des tests de détection et de génotypage des HPV, a été réalisée (6). Elle s'est déroulée sous forme d'une enquête préalable et a permis de renseigner :

- le ou les milieux de transport acceptés ;
- le réactif de détection ou de génotypage utilisé ;
- le nombre de techniques utilisées par chaque structure.

► Milieux de transport

Dix-neuf milieux de transport sont acceptés⁸ par les 74 structures : 7 milieux pour la cytologie (tous commercialisés) et 12 pour la recherche d'HPV (11 milieux commercialisés et un milieu maison).

- ▶ 39 structures acceptent un seul milieu ;
- ▶ 16 structures acceptent 2 milieux ;
- ▶ 7 structures acceptent 3 milieux ;
- ▶ 2 structures acceptent plus de 3 milieux ;
- ▶ pour 9 structures cette information n'a pas été précisée.

► Techniques de détection/génotypage des HPV

Seize techniques de détection/génotypage des HPV sont utilisées par les laboratoires : 12 trousse commerciales comprenant six trousse de détection (dont certaines permettent une identification des HPV 16 et HPV 18) et six trousse de génotypage, plus 4 techniques « maison ».

Quatre laboratoires utilisent 2 techniques et un laboratoire utilise 3 techniques.

► Validation des milieux de transport avec les techniques de recherche de l'ADN des HPV utilisées par les laboratoires

Les résultats de l'enquête, auprès des 57 laboratoires participants, ont montré que :

⁶ Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.

⁷ Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.

⁸ Les prélèvements sont adressés par le laboratoire d'anatomocytologie (qui définit le milieu de transport) au laboratoire de virologie.

- aucun milieu pour la cytologie n'est utilisé exclusivement avec la ou les techniques de recherche des HPV oncogènes pour lesquelles il est validé ;
- un seul milieu virologique est utilisé exclusivement avec la technique pour laquelle il est validé ;
- les autres liquides virologiques sont utilisés avec une à trois techniques pour lesquelles ils ne sont pas validés.

Dans l'ensemble, sur les 12 trousse commercialisées, seules cinq sont utilisées exclusivement avec des milieux qui sont validés, les 7 autres trousse sont utilisées avec au moins un milieu qui n'a pas été validé (25).

Or la directive européenne 98/79/CE prévoit le cas des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* utilisés en combinaison. La notice doit notamment indiquer les dispositifs à utiliser pour que la combinaison soit sûre et adéquate : « *Lorsque le dispositif est destiné à être utilisé en combinaison avec d'autres dispositifs ou équipements, l'ensemble de la combinaison, y compris le système de raccordement, doit être sûr et ne pas porter atteinte aux performances prévues des dispositifs. Toute restriction d'utilisation doit figurer sur l'étiquetage et/ou dans la notice d'utilisation* ».

En conclusion, cette enquête sur la phase pré-analytique a pu montrer qu'un seul milieu pour la recherche d'HPV était utilisé exclusivement avec la trousse de détection pour laquelle il est validé alors que tous les autres sont toujours utilisés avec au moins une trousse pour laquelle ils ne sont pas validés.

Si cette étude, réalisée dans le cadre du CNQ de l'ANSM en 2011, a permis de montrer certaines non conformités des milieux de transport avec les trousse de détection des HPV et/ou de génotypage, elle ne permettait pas d'en analyser l'impact sur le résultat. En effet, l'absence d'un milieu universel pour tous les réactifs de détection ou de génotypage, avait contraint l'ANSM à fournir les échantillons élaborés pour le contrôle qualité dans un milieu (PBS⁹) (26)

Cette limite du CNQ à ne pas pouvoir appréhender les problèmes et les erreurs qui surviennent dans la phase pré-analytique a été soulignée par le rapport IGAS de 2006 (27) qui a rappelé par ailleurs que c'est dans cette phase que les erreurs sont les plus fréquentes.

⁹ PBS : tampon phosphate saline.

2. Problématique et objectifs du travail

La phase pré-analytique d'un examen est classiquement décrite comme un ensemble d'étapes : le prélèvement de l'échantillon biologique sur un être humain, le recueil des éléments cliniques pertinents, la préparation de l'échantillon, son transport et sa conservation jusqu'à l'endroit où il est analysé.

La littérature s'accorde à reconnaître que la fréquence des erreurs est la plus élevée au niveau de la phase pré-analytique (27,28) avec une répartition du pourcentage d'erreurs détectées entre les 3 phases se répartissant de la manière suivante (29) :

- pré-analytique 85 % ;
- analytique 4 % ;
- post-analytique 11 %.

La phase pré-analytique dans le contexte du test HPV est d'autant plus importante qu'elle fait appel à plusieurs intervenants (cliniciens, anatomocytopathologistes, biologistes médicaux), plusieurs milieux de transport, plusieurs circuits d'acheminements et plusieurs étapes.

La première étape qui consiste au prélèvement du FCU, est réalisée dans le cabinet ou le service, du professionnel de santé clinicien qui peut notamment être un gynécologue, un médecin généraliste ou une sage-femme.

Le prélèvement est ensuite déchargé dans un milieu de transport qui peut être soit validé pour la cytologie soit validé pour la recherche d'HPV soit validé pour ces deux examens. De plus, compte tenu de la multiplicité des tests de détection d'HPV, même si un milieu de transport est validé pour un test de détection donné, il ne l'est pas forcément pour les autres.

A cette complexité se rajoute d'une part l'existence de deux types de cytologie : conventionnelle et en phase liquide et d'autre part le fait que la détection d'HPV peut être réalisée par deux professionnels différents, les ACP et les biologistes médicaux.

Il faut enfin noter que selon les recommandations en vigueur le test HPV est préconisé suite à une cytologie ASC-US, soit environ 3 % des cas ; dans 97 % des cas, la cytologie n'est donc pas suivie d'une recherche d'HPV.

Le frottis en phase liquide peut ainsi emprunter différents circuits selon qu'il est réalisé en première intention pour la cytologie et/ou pour la détection d'HPV et selon que le test d'HPV est réalisé au laboratoire de biologie médicale ou dans la structure d'ACP :

- Si le prélèvement destiné en première intention à la cytologie, le FCU est déchargé dans un milieu de transport qui doit convenir à la cytologie et à la recherche d'HPV, il est adressé par le clinicien à la structure d'ACP qui en cas de frottis ASC-US et après avis du clinicien :
 - l'adressera au laboratoire de biologie médicale ou à une autre structure ACP pour la réalisation du test HPV,
 - ou réalisera le test HPV elle-même si elle dispose de la technique ad hoc.
- Si le FCU est destiné en première intention au test HPV (après diagnostic ASC-US sur frottis conventionnel), le frottis est déchargé dans un milieu conforme à la recherche d'HPV et ensuite adressé par le clinicien au laboratoire de biologie médicale ou à la structure d'ACP.

Il convient aussi de rappeler la spécificité du contexte réglementaire de cet examen. En effet, s'il est réalisé par un laboratoire de biologie médicale, il est régi par le GBEA ou par la norme NF EN ISO 15189 (pour les laboratoires qui sont entrés dans la démarche d'accréditation volontaire). Si la recherche d'HPV est réalisée dans une structure d'ACP, le GBEA n'a pas de valeur réglementaire, ni la norme NF EN ISO 15189 (sauf pour les structures engagées dans une démarche d'accréditation volontaire). Enfin, il est à noter que le prélèvement n'étant pas réalisé au laboratoire de biologie médicale ou dans la structure d'ACP, ces derniers reçoivent un prélèvement qui a

traversé plusieurs étapes dont ils n'ont pas géré la phase pré-analytique et dont ils ne peuvent attester de la qualité.

Dans un tel contexte, très multifactoriel, si toutes les étapes ne sont pas coordonnées et réalisées conformément aux bonnes pratiques et aux règles d'assurance qualité, les risques d'erreurs peuvent être multiples.

Au regard des éléments du contexte, l'une des principales non-conformités relevées dans la phase pré-analytique (enquête du CNR de 2009 et étude de l'ANSM et du CNR en 2011), concerne l'utilisation de milieux de transport cellulaire non validés avec les trousse de détection et/ou génotypage d'HPV utilisées par les laboratoires.

Ce constat interpelle et renvoie notamment aux diverses autres anomalies susceptibles d'être rencontrées à toutes les étapes de la phase pré-analytique. Il pourrait s'agir notamment :

- de l'identification et de la traçabilité des prélèvements ;
- du choix du matériel de prélèvement cervico-vaginal ;
- des modalités pratiques du prélèvement cervico-vaginal ;
- du délai de transport et de conservation ;
- de la température de transport et de conservation ;
- de la phase d'extraction et de purification de l'ADN ;

En définitive, l'objectif de ce travail qui se place dans le cadre de l'indication de recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes, recommandée et prise en charge par l'Assurance Maladie (frottis cervico-utérin ASC-US), est :

- d'identifier les facteurs pré-analytiques susceptibles d'interférer avec les résultats de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes ;
- d'établir les conditions de réalisation de la phase pré-analytique de cette recherche.

3. Méthode d'évaluation

La méthode d'évaluation utilisée dans ce rapport s'inspire de la méthode générale d'élaboration d'un rapport d'évaluation d'une technologie de santé par la HAS (cf. annexe I). Elle est fondée sur :

- l'analyse des textes réglementaires identifiés ;
- l'analyse critique des recommandations de bonne pratique identifiées ;
- l'analyse critique des études identifiées de la littérature scientifique ;
- le recueil de la position des professionnels dans le cadre d'auditions individuelles.

3.1 Recherche documentaire

Pour les recommandations de bonne pratique et les études, la recherche a été limitée aux publications en langue anglaise et française, publiées depuis janvier 1998. Une veille bibliographique sur les sites Internet et une mise à jour mensuelle sur Medline ont été réalisées jusqu'en avril 2013.

Les sources suivantes ont été interrogées :

- pour la littérature internationale : les bases de données *Medline* ;
- sites Internet d'organismes diffusant des recommandations et/ou des évaluations technologiques ;
- les sites internet des sociétés savantes compétentes dans le domaine étudié.

Cette recherche a été complétée par les références citées dans les documents analysés.

La stratégie de recherche et la liste des sources interrogées sont détaillées dans l'annexe 2.

Pour la partie réglementaire, le texte a été rédigé à partir de différents documents publiés sur les sites internet du Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, du COFRAC et du site web officiel du Gouvernement français pour la publication des textes légaux et la diffusion d'une partie des décisions juridiques de droit français (www.legifrance.gouv.fr/).

► Sélection des recommandations et des études

La recherche bibliographique présentée ci-dessus a permis d'identifier **304 documents**. A la lecture des titres et résumés, les documents présentant les caractéristiques suivantes ont été retenus :

- les études concernant les techniques de prélèvement ;
- les études comparant différents sites de prélèvement ;
- les études concernant les milieux de transport ;
- les études évaluant l'impact des conditions de conservation des prélèvements ;
- les études évaluant les techniques d'extraction de l'ADN ;
- six recommandations de bonnes pratiques.

Cette première sélection a permis de retenir 30 documents

Une lecture plus approfondie des articles (sélection sur article *in extenso*) a permis d'exclure les études :

- dont la stratégie diagnostique utilisait l'hybridation *in situ* ;
- dont la stratégie diagnostique de référence était uniquement l'histocytologie ;
- comparant les techniques analytiques de diagnostic ;
- évaluant l'auto-prélèvement ;
- se référant à des modèles animaux ;
- épidémiologiques et de stratégie de dépistage ;
- relatives aux traitements.

Au terme de la sélection, 21 documents ont été retenus.

La veille bibliographique a permis de sélectionner 2 documents supplémentaires.

3.2 Position des professionnels de santé

3.2.1 Méthode de recueil de la position argumentée des professionnels interrogés

Compte-tenu du caractère très technique de cette évaluation, la position des professionnels a été recueillie selon une procédure d'audition semi-directive réalisée au moyen d'un questionnaire préétabli (cf. annexe 7). Les 11 experts ayant participé à ce travail ont été auditionnés individuellement en mai 2013 et interrogés sur les conditions pré-analytiques de réalisation de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes, sur la base de leurs pratiques et de leurs expériences. Leurs propos ont été recueillis par la HAS qui a rédigé les comptes rendus de ces auditions ; chaque compte rendu ayant ensuite été validé par la personne auditionnée. Ces CR figurent dans leur intégralité en annexe 8 ; une synthèse globale de ces CR est présentée dans le chapitre 6 de ce rapport.

3.2.2 Spécialités sollicitées

Compte-tenu du sujet, il a été décidé d'interroger les disciplines suivantes :

- ▶ Anatomocytopathologistes ;
- ▶ biologistes médicaux ;
- ▶ gynécologues (gynécologues obstétriciens, gynécologues médicaux) ;
- ▶ infectiologues ;
- ▶ médecins généralistes ;
- ▶ sage-femmes.

En conséquence, les organismes professionnels suivants ont été sollicités pour indiquer des noms de professionnels :

- ▶ Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français ;
- ▶ Société Française de Gynéco-pathologie ;
- ▶ Société de Chirurgie Gynécologique et Pelvienne ;
- ▶ Société Française de Colposcopie et de Pathologie Cervico-vaginale ;
- ▶ Conseil National Professionnel des Pathologistes ;
- ▶ Société Française de Biologie Clinique ;
- ▶ Société Française de Microbiologie ;
- ▶ Fédération Française d'Infectiologie ;
- ▶ Collège de la médecine générale ;
- ▶ Association de sages-femmes enseignantes Françaises.

Le Collège de la médecine générale n'a pas répondu.

A partir des noms ainsi obtenus, un groupe de professionnels a été sélectionné en respectant autant que possible une répartition homogène des différentes spécialités, des différents modes d'exercice et des différents lieux d'exercice.

3.2.3 Composition du groupe d'expert

La composition nominative du groupe d'experts auditionnés est la suivante :

M ^{me} Geneviève AILLET	Anatomie et cytologie pathologiques, Institut D'histo-pathologie, Nantes (44104)
M ^{me} Christine BERGERON	Anatomie et cytologie pathologiques et gynécologique, Laboratoire CERBA, Cergy Pontoise (95066)
M ^{me} Christine CLAVEL-CRAVOISIER	Biologie cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire de REIMS, Hôpital de la Maison Blanche, Laboratoire Pol Bouin, Reims (51092)
M ^{me} Isabelle HEARD	Gynécologie obstétrique, Institut Pasteur, Paris (75724)
M. Jean LEVÉQUE	Gynécologie obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Hôpital Anne de Bretagne, Rennes (35203)
M. Jean-Luc MERGUI	Gynécologie obstétrique, Cabinet Médical, Paris (75116)
M ^{me} Hélène PEIGUE-LAFEUILLE	Microbiologie-Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de CLERMONT-FERRAND, Centre de Biologie, Clermont-Ferrand (63003)
M ^{me} Michèle RIVIÈRE	Sage femme, Université Pierre et Marie Curie, École des sages femmes, Paris (75571)
M. Jean Luc SCHMIT	Pathologies infectieuses et tropicales, Centre Hospitalier Universitaire d'AMIENS, Hôpital Nord, Amiens (80054)
M. Henri SEVESTRE	Anatomie et cytologie pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire d'AMIENS, Hôpital Nord, Amiens (80054)
M. Jean-Paul TAAR	Biologie médicale, Laboratoire de biologie médicale du 93 ZERAH - TAAR – PFEFFER, Bagnolet (93170)

3.2.4 Déclaration d'intérêts

Les déclarations publiques d'intérêts (DPI) des experts ayant participé aux auditions ont toutes été analysées selon le « Guide des déclarations d'intérêts et de gestion des conflits d'intérêts » de la HAS de mars 2010.

Le Bureau de la Commission nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et des technologies de santé (CNEDiMTS) a jugé que les intérêts déclarés étaient compatibles avec la participation de ces différents experts dans le cadre d'auditions individuelles.

Toutes les DPI des experts auditionnés sont consultables sur le site de la HAS¹⁰.

¹⁰ http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/guide_dpi.pdf

4. Aspects réglementaires

En France, la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de frottis cervico-utérins (FCU) est réalisée par des laboratoires de biologie médicale, habituellement sous la responsabilité d'un biologiste médical, ou dans une structure d'anatomie et de cytologie pathologiques (ACP), habituellement sous la responsabilité d'un médecin spécialisé en ACP. La détection du génome des HPV oncogènes peut ainsi être qualifiée « d'acte frontière » dans la mesure où cet acte qui recourt à des techniques de biologie moléculaire, est réalisé par les biologistes médicaux ou par les médecins spécialisés en ACP.

4.1 La recherche du génome (ADN) des HPV oncogène à partir de frottis cervico-utérins réalisé dans un laboratoire de biologie médicale

La loi n°2013-442, adoptée le 30 mai 2013, a réformé la biologie médicale et a ainsi modifié certaines dispositions du code de la santé publique issues de l'ordonnance du 13 janvier 2010¹¹.

4.1.1 L'examen de biologie médicale

Depuis la loi du 30 mai 2013, un examen de biologie médicale se définit comme « un acte médical qui concourt à la prévention, au dépistage, au diagnostic ou à l'évaluation du risque de survenue d'états pathologiques, à la décision et à la prise en charge thérapeutiques, à la détermination ou au suivi de l'état physiologique ou physiopathologique de l'être humain, hormis les actes d'anatomie et de cytologie pathologiques, exécutés par des médecins spécialistes dans ce domaine¹² ».

En revanche, les actes d'ACP ne sont pas définis par le code de la santé publique. En effet, il n'existe pas actuellement de cadre juridique particulier pour l'ACP¹³.

Selon l'article L. 6211-2 du code de la santé publique, un examen de biologie médicale se déroule en trois phases :

- une phase pré-analytique ;
- une phase analytique ;
- une phase post-analytique.

En l'espèce, ce rapport s'intéresse aux étapes pré-analytiques de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de FCU.

La phase pré-analytique comprend le prélèvement d'un échantillon biologique sur un être humain, le recueil des éléments cliniques pertinents, la préparation, le transport et la conservation de l'échantillon biologique jusqu'à l'endroit où il est analysé¹⁴.

Lorsque la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de FCU est réalisée au sein d'un laboratoire de biologie médicale, cette activité doit, conformément aux dispositions en vigueur, être accréditée.

¹¹ L'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 avait pour objet de réformer les conditions de création, d'organisation et de fonctionnement des laboratoires de biologie médicale.

¹² Article L. 6211-1 du code de la santé publique.

¹³ Rapport anatomie et cytologie pathologiques du Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, 15 avril 2012

¹⁴ Article L. 6211-2 du code de la santé publique.

4.1.2 L'accréditation des laboratoires de biologie médicale

L'accréditation de l'ensemble des laboratoires de biologie médicale, préconisée notamment dans le rapport de Michel BALLEREAU¹⁵, doit selon ce dernier « faire évoluer la biologie médicale avec la mise à niveau de la qualité des prestations, médicales et techniques, et de la qualité du service rendu au patient ».

L'article L. 6221-1 du code de la santé publique, modifié par la loi du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale, prévoit qu'un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation.

L'accréditation d'un laboratoire de biologie médicale est délivrée, à sa demande, par le Comité français d'accréditation¹⁶ (Cofrac), lorsqu'il satisfait aux critères définis par les normes harmonisées en vigueur applicables aux laboratoires de biologie médicale, dont les références sont fixées par un arrêté des ministres chargés de la santé et de l'industrie, pris après avis de la Haute Autorité de Santé¹⁷.

L'accréditation d'un laboratoire de biologie médicale porte sur les trois phases des examens de biologie médicale : pré-analytique, analytique et post-analytique.

L'article L. 6221-1 du code de la santé publique précise également que l'accréditation porte sur les examens d'anatomie et de cytologie pathologiques¹⁸ figurant soit à la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) soit à la nomenclature générale des actes professionnels (NGAP), lorsqu'ils sont réalisés dans un laboratoire de biologie médicale.

Ainsi, devront être accrédités les laboratoires de biologie médicale réalisant des examens de biologie médicale mais également des examens d'anatomie et de cytologie pathologiques parmi ceux figurant à la NABM et à la NGAP¹⁹.

Il ressort donc de cette disposition que c'est le statut de la structure qui réalise les examens qui importe et non la nature des actes qui y sont réalisés. En effet, c'est bien le laboratoire de biologie médicale en tant que structure qui devra être accrédité et ce pour l'ensemble de son activité, quelle qu'elle soit.

Actuellement, la norme d'accréditation en vigueur applicable aux laboratoires de biologie médicale est la norme NF EN ISO 15189 qui « spécifie les exigences de qualité et de compétence propres aux laboratoires d'analyses de biologie médicale »²⁰.

La loi du 30 mai 2013 a modifié l'article 7 de l'ordonnance du 13 janvier 2010 qui fixe désormais le calendrier suivant pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale :

- à compter du 1^{er} novembre 2016, les laboratoires de biologie médicale ne pourront fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 50 % des examens de biologie médicale qu'ils réalisent ;

¹⁵ Ministère de la santé de la jeunesse des sports et de la vie associative, Ballereau M. Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale. Paris: Ministère de la santé de la jeunesse des sport et de la vie associative; 2008.

http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_pour_la_biologie_medicale.pdf.

¹⁶ Décret n° 2008-1401 du 19 décembre 2008 relatif à l'accréditation et à l'évaluation de conformité pris en application de l'article 137 de la loi n° 2008-776 du 4 août 2008 de modernisation de l'économie.

¹⁷ Article L. 6221-2 du code de la santé publique.

¹⁸ Article L. 6212-2 du code de la santé publique : «Un laboratoire de biologie médicale peut également réaliser des activités biologiques d'assistance médicale à la procréation ainsi que des examens d'anatomie et de cytologie pathologiques [...] ».

¹⁹ Il est à noter que les actes d'anatomie et cytologie pathologiques pris en charge par l'Assurance Maladie ont été récemment (mai 2010) transférés de la NGAP à la Classification commune des actes médicaux (CCAM).

²⁰ AFNOR : <http://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-15189/laboratoires-d-analyses-de-biologie-medecale-exigences-particulieres-concernant-la-qualite-et-la-competence/article/665802/fa142486>

- à compter du 1^{er} novembre 2018, les laboratoires de biologie médicale ne pourront fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 70 % des examens de biologie médicale qu'ils réalisent ;
- à compter du 1^{er} novembre 2020, les laboratoires de biologie médicale ne pourront fonctionner sans disposer d'une accréditation portant sur 100 % des examens de biologie médicale qu'ils réalisent.

En définitive, l'ensemble des laboratoires de biologie médicale devra être accrédité à 100 % au 1^{er} novembre 2020.

Il est à noter qu'un certain nombre de laboratoires de biologie médicale sont d'ores et déjà accrédités selon la norme NF EN ISO 15189 ; il s'agit là d'une démarche volontaire de la part de ces laboratoires.

Par ailleurs, la loi du 30 mai 2013 prévoit que jusqu'au 31 octobre 2020 « aucun laboratoire de biologie médicale non accrédité, au sens de l'article L. 6221-1 du code de la santé publique, ne peut fonctionner sans respecter les conditions déterminées par un arrêté du ministre chargé de la santé relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale »²¹.

Cela signifie que dans l'attente de l'obtention de leur accréditation, les laboratoires de biologie médicale doivent respecter les règles de bonne exécution des analyses de biologie médicale contenues dans le « Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale » (GBEA) issu de l'arrêté du 26 novembre 1999²².

Le GBEA énonce les règles de bonnes pratiques de réalisation des examens de biologie médicale.

Dans sa version actuelle, le GBEA consacre une partie à l'exécution des analyses de biologie médicale. En effet, il est notamment précisé dans ce guide que « tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit disposer de procédures et de modes opératoires écrits, datés et techniquement validés, afin d'assurer la qualité des résultats et la conformité au guide ».

S'agissant des prélèvements des échantillons biologiques, le guide énonce que « le biologiste fournit aux médecins prescripteurs toutes les précisions utiles aux conditions de mise en œuvre des analyses médicales. Les échantillons doivent, dans toute la mesure du possible, être associés à une " fiche de suivi médical " comportant tous les renseignements nécessaires à la bonne exécution des analyses et à l'interprétation des résultats ».

Ainsi, l'exécution des examens de biologie médicale obéit actuellement à des règles précises fixées dans le GBEA.

Une synthèse des principaux éléments relatifs à la phase pré-analytique est présentée dans les encadrés qui suivent, une version plus complète est disponible en annexe 5.

²¹ Article 7 de l'ordonnance du 13 janvier 2010 tel que modifié par la loi n°2013-442 du 30 mai 2013.

²² Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale modifié par un arrêté du 26 avril 2002.

Prélèvement et identification des échantillons biologiques

- Le biologiste fournit aux médecins prescripteurs toutes les précisions utiles aux conditions de mise en œuvre des analyses médicales.
- Les échantillons doivent, dans toute la mesure du possible, être associés à une « *fiche de suivi médical* » comportant tous les renseignements nécessaires à la bonne exécution des analyses et à l'interprétation des résultats.
- Le prélèvement peut être effectué par le médecin prescripteur, par le biologiste ou par du personnel qualifié et autorisé conformément à la réglementation en vigueur ;
- Le biologiste vérifie la conformité des échantillons biologiques acceptés dans son laboratoire.
- Il doit refuser tout échantillon prélevé ou transmis dans des conditions non conformes aux procédures techniques et réglementaires.
- Le récipient destiné à recevoir l'échantillon biologique doit être adapté à la nature de l'échantillon et à celle des analyses.
- L'étiquetage doit être conçu pour éviter toute erreur sur l'identité de la personne. Il doit mentionner, outre l'identité et la date de naissance, déclinées par le patient lui-même dans la mesure du possible, le nom de jeune fille si une procédure le prévoit, le sexe, la nature de l'échantillon, le nom du préleveur, la date et, chaque fois qu'une procédure le prévoit, l'heure du prélèvement et/ou sa localisation.
- Si la taille du tube ne permet pas l'apposition d'une étiquette comportant l'ensemble des renseignements précités, ce tube étiqueté est placé dans un récipient individuel où toutes les indications ci-dessus sont mentionnées de façon à éviter toute erreur.
- Le biologiste doit mettre en place une procédure permettant de lier l'échantillon biologique au patient, même si l'identité de celui-ci est incomplète ou approximative.
- Si un étiquetage code-barres est utilisé, il ne doit pas masquer les renseignements énoncés en clair.
- Lors de la préparation de fractions aliquotes, l'étiquetage des tubes ou récipients secondaires doit se faire selon les procédures rigoureuses permettant l'identification sans ambiguïté de chaque échantillon au sein du poste de travail ou du poste de stockage.

Transport, transmission et conservation des échantillons

- Le transport des échantillons doit respecter des règles qui assurent l'intégrité de l'échantillon et la sécurité des personnels.
- Des procédures et des modes opératoires écrits par le laboratoire qui effectue l'analyse doivent fixer les conditions particulières de délai de transport, de température de conservation et d'intégrité de l'emballage des échantillons biologiques.
- Le transport des échantillons biologiques doit s'effectuer le plus rapidement possible au laboratoire en prenant toutes les précautions pour éviter les risques de contamination et de dégradation des constituants.
- Le ou les récipients étanches contenant les échantillons biologiques doivent être insérés dans une boîte étanche, tapissée par un matériau absorbant et l'ensemble placé dans un emballage extérieur résistant, portant les noms et adresses du laboratoire destinataire et de l'expéditeur.
- L'étiquetage et la résistance des emballages doivent être conformes à la réglementation en vigueur.
- Si l'échantillon doit être transmis à un autre laboratoire, la « fiche de suivi médical » ou sa copie ou, à défaut, une fiche de renseignements établie par le biologiste doit être associée.
- Les dates et les heures de réception des échantillons biologiques au laboratoire destinataire doivent être enregistrées.
- Les conditions de conservation doivent être conformes aux règles de sécurité et d'hygiène en vigueur pour éviter toute contamination du personnel ou toute pollution.
- Les échantillons de calibrage et de contrôle doivent être conservés avec soin dans les conditions précisées par le fabricant.
- Avant exécution des analyses, si celles-ci sont différées, les échantillons et leurs fractions aliquotes doivent être conservés dans des conditions qui préservent leur qualité.
- Les conditions d'identification, de fermeture des récipients et de température de conservation doivent être rigoureusement observées pour éviter tout risque d'erreur, de modification qualitative et/ou quantitative et de contamination.
- La durée de conservation pour chaque cas particulier doit, si elle n'est pas réglementée, être fixée par le biologiste et inscrite sur les procédures opératoires.

Cas particulier des examens utilisant les techniques de biologie moléculaire

- Le prélèvement et le transport des échantillons biologiques ainsi que l'exécution des analyses doivent répondre aux règles générales énoncées plus haut.
- Des conditions particulières au type d'analyse sont susceptibles d'être fixées par des procédures et modes opératoires spécifiques.

Les techniques analytiques doivent :

- soit utiliser des réactifs conformes à la réglementation en vigueur et employés selon le mode opératoire préconisé par le fabricant ;
- soit utiliser des réactifs préparés dans le laboratoire même. Dans ce cas, ces techniques devront être validées scientifiquement, s'appuyer sur des références bibliographiques et faire l'objet de procédures et de modes opératoires détaillés.

Parallèlement au respect du GBEA et à la mise en œuvre de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale, il existe des contrôles de la qualité des résultats des examens de biologie médicale.

4.1.3 Les contrôles de la qualité des résultats des examens de biologie médicale

Le contrôle de la qualité des résultats des examens de biologie médicale est effectué par des organismes d'évaluation externe de la qualité mais également par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.

Selon l'article L. 6221-9 du code de la santé publique, un laboratoire de biologie médicale fait procéder au contrôle de la qualité des résultats des examens de biologie médicale qu'il réalise par des organismes d'évaluation externe de la qualité.

Ces organismes transmettent à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé un rapport annuel, dont la liste des points qu'il doit contenir est déterminée par arrêté du ministre chargé de la santé, pris sur proposition du directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.

L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé rend publique la synthèse annuelle de ces rapports.

Les organismes d'évaluation externe de la qualité signalent immédiatement à l'agence régionale de santé les anomalies constatées au cours de leur contrôle et susceptibles d'entraîner un risque majeur pour la santé des patients.

Selon l'article L. 6221-10 du code de la santé publique, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé assure un contrôle national de la qualité des résultats des examens de biologie médicale, dont les modalités sont fixées par un décret qui détermine notamment les catégories d'examens de biologie médicale soumise à ce contrôle.

Comme indiqué sur le site de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, le contrôle de qualité des analyses de biologie médicale tend à assurer la fiabilité et le perfectionnement des analyses de biologie médicale dans l'intérêt général de la santé publique²³.

4.2 La recherche du génome (ADN) des HPV oncogène à partir de FCU réalisé dans une structure d'anatomie et de cytologie pathologiques

Comme expliqué précédemment, la recherche du génome (ADN) des HPV oncogène à partir de FCU peut également être réalisée au sein de structures d'ACP sous la responsabilité de médecins exerçant cette spécialité.

La spécialité d'ACP peut s'exercer en secteur hospitalier ou en secteur libéral. En secteur hospitalier, la structure d'ACP s'intitule généralement « service » qui peut être intégré dans des pôles²⁴. En secteur libéral, la structure d'ACP peut être :

- une structure spécialisée en actes d'ACP ;
- un laboratoire de biologie médicale comprenant des médecins spécialistes en ACP²⁵.

4.2.1 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.

Le Rapport anatomie et cytologie pathologiques du Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé en date du 15 avril 2012 donne néanmoins une définition : « 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, tissu, organes ou leurs dérivés, prélevés chez les patients dans un but diagnostique de maladie ou de dépistage (prélèvements cytologiques ou biopsiques), thérapeutique (biopsie 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 soin). Il est formalisé par un compte-rendu textuel transmis aux médecins en charge du patient dans le cadre du soin ».

Il est à noter que le rapport du Ministère du 15 avril 2012 préconise la mise en place d'un cadre juridique pour les actes d'ACP.

Les structures d'ACP ne sont pas juridiquement soumises au GBEA ni à la norme NF EN ISO 15189.

En l'absence de cadre juridique, la réalisation des examens d'ACP peut néanmoins se conformer aux recommandations de bonnes pratiques de l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques (AFAQAP), qui est un organisme de médecins spécialisés en ACP.

Les médecins spécialisés en ACP sont ainsi invités à suivre les recommandations élaborées par l'AFAQAP.

²³ ANSM : [http://ansm.sante.fr/Activites/Controle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/CNQ-Dernieres-mises-a-jour/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Controle-national-de-qualite-des-analyses-de-biologie-medicale-CNQ/CNQ-Dernieres-mises-a-jour/(offset)/0)

²⁴ Analyse de la section libérale du syndicat des médecins pathologistes Français (SMPF) de septembre 2012 suite au Rapport anatomie et cytologie pathologiques de la DGOS (avril 2012).

²⁵ Les laboratoires de biologie médicale réalisant des actes d'ACP sont soumis à l'accréditation (cf partie sur « L'accréditation des laboratoires de biologie médicale »).

Selon l'AFAQAP, ces recommandations seront « l'outil indispensable pour une meilleure qualité de prise en charge des actes d'anatomie et de cytologie pathologiques »²⁶ et doivent être considérées comme « un guide permettant d'aider les pathologistes dans leur exercice quotidien, et non comme un document opposable à la profession ». La dernière version de ces recommandations date de 2009²⁷.

S'agissant des prélèvements, l'AFAQAP a établi des recommandations sur la transmission, la réception et l'enregistrement de ces derniers. L'AFAQAP prévoit que chaque structure d'ACP définit :

- les règles d'identification du patient et du prélèvement ;
- les modalités de gestion du prélèvement avant son conditionnement ;
- les modalités de conditionnement du prélèvement (flacon, pot, sac, étiquetage, fixateur, etc.) ;
- les conditions et délais d'acheminement du prélèvement, selon ses caractéristiques ;
- les règles de sécurité et de confidentialité entourant le prélèvement.

L'AFAQAP précise que les procédures sont élaborées en partenariat avec les praticiens préleveurs.

S'agissant de la mise en œuvre des techniques, l'AFAQAP prévoit que toutes les étapes techniques sont formalisées par des procédures et des modes opératoires et qu'à chaque étape technique l'identification du produit est vérifiée.

Il est à noter qu'en ce qui concerne les actes d'ACP qui font appel à des techniques de biologie moléculaire, comme la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes, l'AFAQAP préconise de suivre le GBEA (voir chapitre 4.2 du présent rapport).

Les recommandations de l'AFAQAP prévoient également une évaluation des pratiques des structures d'ACP.

4.2.2 La démarche qualité en anatomie et cytologie pathologiques : les recommandations de bonnes pratiques de l'AFAQAP

Comme indiqué dans le Rapport anatomie et cytologie pathologiques du Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, la profession d'anatomie et cytologie pathologiques a organisé « un système d'évaluation et d'assurance qualité autonome en créant en 1992 l'AFAQAP ».

L'AFAQAP s'est donc chargée de définir des recommandations permettant « un exercice optimal de la discipline ».

Les recommandations de l'AFAQAP disposent que toute activité d'anatomie et cytologie pathologiques peut être soumise à évaluation. En effet, il est précisé que « chaque structure définisse ses actions d'évaluations en fonction de ses objectifs et de ses moyens, la priorité étant de se focaliser sur les domaines les plus à risque ».

Selon l'AFAQAP, la qualité des pratiques (organisation, techniques et diagnostics) est régulièrement évaluée par des contrôles qualité internes et externes.

La qualité interne correspond à l'amélioration du fonctionnement interne de la structure. Son objectif est de « mettre en œuvre des moyens permettant de décrire au mieux l'organisation, de repérer, de limiter et de prévenir les dysfonctionnements ».

L'AFAQAP définit l'évaluation, qu'elle soit interne ou externe, comme « une appréciation qualitative et/ou quantitative [...] des moyens et méthodes mis en œuvre, permettant de déterminer si une entité satisfait aux exigences spécifiées ». Les exigences peuvent être celles des référentiels de bonnes pratiques, des normes ou des objectifs fixés en interne.

²⁶ <http://www.afaqap.org/ecrire/upload/200403011000200.RBPACP.pdf>

²⁷ http://www.afaqap.org/ecrire/upload/201001181206340.RBPACP%20v2_2009-web.pdf

Malgré l'absence d'obligation légale d'accréditation pour les structures d'ACP, les recommandations de l'AFAQAP préconisent la mise en œuvre de démarches qualité pour ces structures.

Actuellement, la mise en œuvre de la démarche qualité pour l'ACP est totalement volontaire. Le rapport anatomie et cytologie pathologiques indique qu'en 2012 trois cabinets d'ACP se sont portés volontaires auprès du Cofrac pour être accrédités selon la norme NF EN ISO 15189. Les structures d'ACP n'ont donc aujourd'hui pas l'obligation d'être « accréditées ».

En 2012, le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé envisageait dans son rapport trois options pour encadrer la démarche en ACP²⁸ :

- publier, sous forme d'Arrêté, les bonnes pratiques en ACP²⁹ selon l'ancien modèle de la biologie médicale ;
- rendre obligatoire une certification des structures d'ACP selon la norme ISO 9001³⁰ ou selon un autre référentiel ;
- rendre obligatoire une accréditation selon une norme internationale en vigueur.

En conclusion, la démarche qualité en ACP n'est aujourd'hui pas intégrée dans les textes réglementaires. Les recommandations de bonnes pratiques de l'AFAQAP préconisent l'engagement de la discipline dans une démarche d'accréditation, cependant celui-ci reste uniquement volontaire. Le Rapport anatomie et cytologie pathologiques de 2012 du Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé propose notamment la mise en œuvre d'une démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, relative aux laboratoires de biologie médicale, « avec un guide technique d'adaptation propre à l'ACP, en fixant le périmètre des techniques à évaluer et le calendrier de la démarche ».

Au total, la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de frottis cervico-utérins est un acte réalisé dans un laboratoire de biologie médicale ou dans une structure d'anatomie et de cytologie pathologiques, d'où l'appellation d'« acte frontière ».

Si la recherche est réalisée dans un laboratoire de biologie médicale, elle doit répondre à des exigences législatives et réglementaires (GBEA actuellement et norme NF EN ISO 15189 dans le cadre de l'accréditation).

Si elle est réalisée dans une structure d'anatomie et de cytologie pathologiques, alors ces exigences législatives et réglementaires ne s'appliquent pas mais il existe des Recommandations de bonnes pratiques établies par la profession d'anatomie et de cytologie pathologiques, que les anatomo-cytopathologistes sont invités à suivre. Pour ce qui est des actes utilisant des techniques de biologie moléculaire - comme la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de FCU - ces Recommandations préconisent de suivre les directives du GBEA.

Par ailleurs, il est possible pour les structures d'ACP de s'accréditer volontairement auprès du Cofrac selon la norme NF EN ISO 15189.

En conséquence, bien que la biologie médicale et l'anatomie et la cytologie pathologiques ne soient pas encadrées par des textes de même valeur juridique (textes législatifs et réglementaires pour la première et recommandations professionnelles pour la seconde), ces textes s'inscrivent tous dans la même démarche en suivant ou en s'inspirant du GBEA.

²⁸ Rapport anatomie et cytologie pathologiques du Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé, 15 avril 2012.

²⁹ Anatomie et cytologie pathologiques.

³⁰ La norme ISO 9001 définit des exigences relatives à l'organisation d'un système de gestion de la qualité. Dans le cadre de la certification de services, seule la norme ISO 9001 est applicable au niveau européen.

5. Recommandations de bonnes pratiques (RBP) de réalisation de la phase pré-analytique

Six recommandations de bonne pratique nationales et internationales définissant les conditions optimales relatives aux étapes de prélèvement, de transport et de conservation des échantillons ont été identifiées : trois concernent l'examen cytologique d'un FCU, trois la biologie moléculaire dont une qui rappelle les exigences spécifiques aux prélèvements cervicaux.

5.1 RBP nationales et internationales relatives au prélèvement d'un FCU en vue de la réalisation de l'examen cytologique

Ces recommandations identifiées dans la littérature concernant l'étape de prélèvement sont relatives aux conditions nécessaires à la réalisation d'une cytologie optimale. Cependant, compte tenu que, dans la majorité des cas, cette étape reste commune à la cytologie et aux tests moléculaires, ces recommandations sont décrites dans le présent travail.

5.1.1 Recommandations de l'ANAES définissant les conditions optimales du prélèvement d'un FCU (2002)

L'ANAES en 2002 (3) a élaboré des recommandations relatives à la « Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal. Ces recommandations reposent sur la méthode décrite dans le guide « Les recommandations pour la pratique clinique – Base méthodologique pour leur réalisation en France », publié par l'ANAES en 1999 et disponible sur le site de la HAS www.has-sante.fr.

L'ANAES a rappelé que le respect d'un certain nombre de recommandations est nécessaire à l'amélioration de la qualité des FCU. Celles-ci prévalent aussi bien pour le frottis conventionnel que pour le frottis en milieu liquide :

- ▶ le frottis devrait être effectué à distance des rapports sexuels (48 heures), en dehors des périodes menstruelles, de toute thérapeutique locale ou d'infection et si nécessaire après traitement œstrogénique chez la femme ménopausée ;
- ▶ il est important d'expliquer à la patiente le but de l'examen et la technique, et de la rassurer ;
- ▶ il faut éviter de faire le toucher vaginal avant le frottis et d'utiliser un lubrifiant ;
- ▶ avant de faire le frottis, le col doit être correctement exposé à l'aide d'un spéculum ;
- ▶ le prélèvement doit concerner la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol.

L'ANAES a souligné par ailleurs que pour :

- ▶ *Le frottis conventionnel (ou selon Papanicolaou)* : il est recommandé d'utiliser une spatule d'Ayre associée à une brosse ou à un porte-coton, ou un Cervex Brush®™ ou une spatule d'Ayre modifiée qui permettent de prélever à la fois au niveau de l'orifice cervical externe et au niveau de l'endocol (**grade A**).
- ▶ *Le frottis en milieu liquide* : le prélèvement, comme pour le frottis conventionnel, est fait avec un outil adapté. Le matériel prélevé est mis en suspension dans le flacon qui contient le liquide de conservation. L'étalement n'est donc pas fait par le clinicien³¹.

³¹ En absence de gradation, les recommandations proposées reposent sur un accord professionnel entre les membres des groupes de travail et de lecture.

5.1.2 Recommandations européennes d'assurance qualité relatives aux FCUs conventionnels ou en phase liquide destinés à la cytologie (2007)

Ces recommandations (30) publiées en annexe de la deuxième édition des Recommandations pour le dépistage du cancer dans l'Union Européenne définissent la méthode de réalisation d'un frottis conventionnel ou en phase liquide pour une cytologie satisfaisante.

Le processus d'élaboration de ces lignes directrices repose sur une revue systématique des données de la littérature et sur un consensus des experts. Une équipe multidisciplinaire 48 experts (anatomopathologistes, épidémiologistes, généralistes, gynécologues, virologues et spécialistes au service des sciences sociales) de 17 états membres, recrutés essentiellement à partir du réseau européen de dépistage du cancer du col de l'utérus (ECCSN)³² et d'éditeurs et d'auteurs, extérieurs à l'ECCSN, ont été désignés pour rédiger, réviser et contribuer à l'élaboration des recommandations.

Pour chaque chapitre, trois reviewers ont été désignés pour commenter le contenu et s'assurer que toutes les références pertinentes disponibles avaient été prises en considération.

Les lignes directrices éditées à l'issue de ce travail tiennent compte du niveau de preuves des articles et reposent sur un consensus d'experts après consultation et discussion avec les reviewers tel que mentionné ci-dessus, mais le grade des recommandations n'est pas précisé.

A propos du site de prélèvement

Les cellules précurseurs du cancer du col se trouvent principalement au niveau de la zone de transformation qui se situe entre l'exocol (épithélium multicouche) et l'endocol (épithélium colonnaire), par conséquent, il est important que le matériau cellulaire soit prélevé dans de cette zone.

A propos des facteurs pouvant affecter la qualité du frottis du col de l'utérus

- perte de sang menstruel, saignements ;
- inflammation ou infection vaginale ;
- rapports sexuels dans les 24 heures précédentes ;
- atrophie sévère des organes génitaux (ménopause);
- grossesse, post-partum et allaitement ;
- irritation physique ou chimique : examen vaginal, crème ou liquide désinfectant, gel lubrifiant, médicaments vaginaux, douche vaginale ou gel spermicide (moins de 24 heures auparavant), colposcopie préalable avec l'acide acétique (moins de 24 heures auparavant), frottis (moins de 3 semaines auparavant), chirurgie cervicale (moins de 3 mois auparavant) ;
- radiothérapie.

A propos de la méthode de réalisation du frottis en phase liquide

Le prélèvement doit être réalisé au niveau de la zone de transformation et pour le frottis en phase liquide seuls les instruments en plastique peuvent être utilisés.

Trois méthodes de prélèvement sont recommandées :

- la brosse pour prélèvement cervico-vaginal (Cervex-Brush®) ;
- la combinaison d'une spatule et d'une cytobrosse pour les prélèvements au niveau de l'exocol et de l'endocol ;
- la spatule à extrémité allongée seule ;

Selon les directives locales, l'une de ces trois méthodes peut être préférée, le prélèvement avec un coton-tige est inapproprié. Par ailleurs :

- une cytobrosse endocervicale ne doit jamais être utilisée seule ;
- le Cervex Brush® est le plus approprié si la femme est enceinte ou que le col saigne facilement.

³² European Cervical Cancer Screening Network.

- ▶ la combinaison des deux méthodes est meilleure si la jonction pavimento-cylindrique est élevée (souvent post-ménopausique), après une opération du col ou s'il y a ectropion étendu de l'épithélium cylindrique.

Les cellules recueillies doivent être rapidement transférées dans un flacon de liquide fixateur conformément aux instructions du fabricant.

- ▶ Pour le milieu ThinPrep®, une simple brosse ou la combinaison d'une spatule en plastique et d'une brosse endocervicale sont recommandées.
- ▶ Pour le système SurePath®, seule la brosse avec une tête amovible est recommandée.

Le protocole de récupération des cellules dans le flacon de collecte dépend également de la technique utilisée ThinPrep®, ou BD SurePath®.

- ▶ Pour le système ThinPrep®, la brosse doit être pressée énergiquement contre le fond du flacon 15 à 20 fois pour enlever tout le matériel cellulaire. L'opération doit être répétée autant de fois que nécessaire afin de s'assurer qu'il ne reste plus aucune matière résiduelle sur les poils de la brosse.
- ▶ Pour la technique BD SurePath®, la tête du balai est détachée dans le flacon de liquide de collecte. Le couvercle du flacon doit être bien fermé pour éviter fuites pendant le transport.
- ▶ Pour tous les autres milieux, les méthodes doivent être conformes aux notices des fabricants.

5.1.3 Recommandations de l'American Society of Cytopathology (2000)

Ces recommandations de l'American Society of Cytology (ASC) relatives à la cytologie cervicale définissent notamment les procédures optimales de prélèvement des FCU (31).

La méthode d'élaboration de ces recommandations n'est pas clairement décrite, elles semblent reposer sur le principe d'obtention d'un consensus au sein de la spécialité concernée puis la soumission aux organisations professionnelles pour approbation. Le grade de ces recommandations n'est pas non plus précisé.

Conditions optimales de réalisation d'un FCU chez les femmes

L'ASC préconise :

- 1) que le frottis soit réalisé 10 à 18 jours après le premier jour de la dernière période menstruelle ;
- 2) l'abstention 48 heures avant le test :
 - ▶ de douche vaginale,
 - ▶ d'utilisation de tampons, mousses contraceptives, gels ou autres crèmes vaginales ou médicaments,
 - ▶ de rapports sexuels.

Matériel de prélèvement

L'ASC rappelle qu'il existe une variété de dispositifs de prélèvement comprenant des brosses endocervicales et des brosses type Cervex Brush®, de même que des spatules en bois et en plastique.

- ▶ Les spatules en plastique sont préférables à celles en bois car le matériel cellulaire y adhère moins.
- ▶ L'utilisation d'un coton-tige n'est pas recommandée.
- ▶ La cytobrosse et la spatule offrent ensemble le meilleur résultat pour la cytologie cervicale selon l'ASC.

Par ailleurs, le choix d'un dispositif particulier dépend des variations de la taille et de la forme du col de l'utérus et de la situation clinique.

Techniques de prélèvement pour les frottis en phase liquide

L'ASC décrit trois techniques de prélèvement pour les frottis en phase liquide et recommande par ailleurs que :

- ▶ seul un matériel de prélèvement validé par la FDA soit utilisé ;
- ▶ quelle que soit la technique utilisée, les instructions des fabricants doivent être suivies.

1) Prélèvement des échantillons cervicaux / vaginaux à l'aide de la spatule

Ces prélèvements au niveau de l'exocol sont réalisés, avec une spatule, en effectuant une rotation de 360 ° à la surface du col utérin. La spatule avec le matériel cellulaire est ensuite déchargée dans le flacon de prélèvement, puis jetée.

2) Prélèvement des échantillons cervicaux / vaginaux à l'aide de la brosse endocervicale

Le prélèvement endocervical se fait par l'insertion d'une brosse dans le canal endocervical et sa rotation selon un angle de 45 à 90°. La brosse endocervicale est ensuite rincée dans le flacon puis jetée.

3) Prélèvement des échantillons cervicaux / vaginal l'aide d'une brosse type Cervex Brush®.

Les prélèvements ectocervicaux et endocervicaux sont recueillis simultanément avec les brosses de type Cervex Brush®. Le centre de la brosse est inséré dans le canal endocervical jusqu'à sa partie latérale qui se trouve entièrement contre l'exocol. Une légère pression est maintenue et la Cervex Brush® est tournée selon une rotation de 360 °, à cinq reprises, dans le sens de l'aiguille d'une montre. La brosse est ensuite déchargée dans le flacon de prélèvement.

5.2 RBP relatives aux examens réalisés avec des techniques de biologie moléculaire

5.2.1 Recommandations de l'AFAQAP (2008, 2009)

En 2008 l'AFAQAP a publié (32) un document dont l'objectif était d'apporter une aide pour l'organisation des structures d'ACP et la mise en place de l'Assurance Qualité, Il intègre toute la documentation disponible en termes de recommandations, de normes et de textes réglementaires. L'AFAQAP rapporte que ce document est issu de la recherche documentaire de la Commission 4 (Organisation et fonctionnement des structures ACP) mais ne décrit pas la méthode de réalisation de façon précise.

En ce qui concerne les examens de biologie moléculaire réalisés par les ACP, les recommandations de l'AFAQAP considèrent que le GBEA est le texte de référence qu'il convient de suivre. En effet, ces recommandations mentionnent que : « *Le biologiste assure la responsabilité d'actes de biologie médicale qui s'inscrivent dans une démarche préventive, diagnostique, pronostique et thérapeutique. Ces actes incluent le prélèvement, l'exécution de l'analyse, la validation des résultats, et si nécessaire leur confrontation avec les données cliniques et biologiques des patients. C'est pourquoi la recherche de la qualité doit être la préoccupation essentielle et constante du biologiste et de l'ensemble du personnel du laboratoire. Le Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale (GBEA) s'adresse à toutes les personnes participant à la réalisation des analyses de biologie médicale, quelles que soient leurs qualifications. C'est un instrument au service de la qualité* » (32).

Dans sa deuxième version des Recommandations de Bonnes Pratiques en ACP éditée en 2009 (33), l'AFAQAP a précisé que ces recommandations n'avaient pas vocation à être opposables à la profession mais qu'elles devaient néanmoins être considérées comme un guide permettant d'aider les pathologistes dans leur exercice quotidien.

L'AFAQAP rapporte que ce document a été réalisé par la commission Organisation et Fonctionnement des structures ACP, qu'il a été validé par le conseil d'administration de l'AFAQAP après avis des sociétés savantes et groupements professionnels de la spécialité. L'AFAQAP ne décrit pas en revanche la méthode d'élaboration ni le grade de ces recommandations.

Concernant les techniques de biologie moléculaire utilisées en ACP dans un but diagnostique, pronostique ou prédictif de réponse thérapeutique et qui sont :

- ▶ les techniques d'hybridation *in situ* de type FISH ou CISH pour ADN et ARN sur lames ;
- ▶ les techniques d'hybridation en phase liquide ;
- ▶ les techniques de PCR sur extraction d'ADN ou d'ARN à partir de tissus ou de cellules,

L'AFAQAP précise que pour réaliser ces techniques, les structures d'ACP suivent les règles de bonne pratique en cours dans les laboratoires de biologie.

Des points spécifiques à la biologie moléculaire ont néanmoins été mis en exergue par l'AFAQAP qui précise dans ses recommandations que :

- les acides nucléiques peuvent être dégradés par un fixateur inadapté (par exemple liquide de Bouin, AFA) ;
- le délai entre excision/biopsie/ponction et préservation tissulaire/cellulaire est adapté à l'analyse réalisée ;
- des précautions sont prises pour éviter la contamination par des RNases ;
- la qualité de l'ADN ou de l'ARN extrait est contrôlée ;
- la mise en œuvre des techniques de PCR fondées sur une amplification d'acides nucléiques impose des contraintes structurelles particulières pour éviter les contaminations croisées à l'origine de résultats faussement positifs (33).

5.2.2 Recommandations 2005 du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Le CLSI est une organisation internationale à but non lucratif, dont la mission est l'élaboration de normes et de lignes directrices dans le domaine de la santé.

L'objectif de ces recommandations du CLSI, élaborées en 2005 (34), était de définir les principes généraux permettant de réduire ou d'éliminer les variables pré-analytiques affectant les résultats de tous les types de tests moléculaires et de tous les types d'échantillons, l'enjeu étant de promouvoir une normalisation de la phase pré-analytique.

La méthode d'élaboration de ces recommandations repose sur un processus de consensus volontaire qui suit un protocole préétabli avec des critères formels :

- l'autorisation du projet ;
- la révision des rapports en réponse aux commentaires des utilisateurs ;
- l'acceptation du rapport comme norme consensuelle ou directive.

La plupart des rapports sont soumis avec deux niveaux de consensus « proposés »³³ et « approuvés »³⁴. Selon qu'ils nécessitent une évaluation sur le terrain ou la collecte de données supplémentaires, certains rapports peuvent également être mis à disposition avec un niveau de consensus intermédiaire.

³³ La version « proposée » du document de consensus subit une première étape d'examen par la communauté médicale. Un examen ligne par ligne de contenu technique et éditorial du document est réalisé, il concernera les aspects techniques, la portée, la méthode et l'utilité du document.

³⁴ Une norme ou une directive « approuvée », a obtenu un consensus au sein de la communauté médicale. Elle devrait néanmoins être examinée pour évaluer l'utilité de la version finale et pour obtenir le consensus une fois toutes les observations sur les versions antérieures résolues.

Les présentes recommandations ont un statut « approuvé », elles décrivent les principes généraux pour assurer des conditions optimales de prélèvement de l'échantillon, de transport, de conservation et d'extraction des acides nucléiques.

Elles sont destinées à tous les professionnels de santé responsables de ces différentes phases pré-analytiques et aux fabricants de dispositifs de collecte d'échantillons, de réactifs de préparation et de trousse visant à l'étude des frottis cervicaux.

Le CLSI a émis des lignes directrices générales pour l'ensemble des prélèvements et des recommandations spécifiques par type de prélèvements.

► Lignes directrices générales définies par le CLSI pour le transport et la conservation des prélèvements destinés aux tests moléculaires

- Les laboratoires suivent les directives du fabricant pour la collecte et le transport des échantillons pour une utilisation avec les kits de tests de diagnostic moléculaire.
- Les échantillons d'ADN purifié sont maintenus en dessous du point de congélation de l'eau pour le stockage à long terme afin de minimiser l'activité de dégradation de DNases.
- Le stockage des échantillons d'ADN purifié est réalisé dans un tube fermé hermétiquement, hydrophobe, en matière plastique, de préférence avec un joint en caoutchouc pour éviter l'évaporation.
- Certains tubes sont plus appropriés que d'autres pour la conservation de l'ADN : les tubes en polypropylène sont associés à une adsorption de l'ADN, les tubes en polyéthylène lient l'ADN encore plus fortement que le polypropylène alors que les tubes de polyallomère et certains tubes en polypropylène spécialement conçus sont plus appropriés pour la conservation de l'ADN.
- L'ADN purifié peut être conservé en toute sécurité dans du tampon Tris-EDTA à température ambiante pendant 26 semaines, entre 2 et 8 °C pendant au moins une année si les DNases contaminantes sont absentes, pour un maximum de sept ans à -20 °C et au moins sept ans à -70 °C ou moins.
- Les échantillons dont la pureté est douteuse doivent être conservés à au moins -20 °C afin d'assurer l'intégrité de l'ADN.

► Recommandations spécifiques aux échantillons cervicaux :

- Les échantillons endocervicaux et vaginaux prélevés pour la détection d'HPV, sont collectés avec du matériel soit en rayonne soit en polyester et placés dans des milieux de transport appropriés, comme spécifié par le fabricant.
- Le matériel de prélèvement (écouvillons, brosses ou autres dispositifs de collecte) doit être placé dans un milieu de transport ou transporté à sec dans un tube scellé tel que recommandé par le fabricant ou par le laboratoire qui effectue l'analyse.
- Selon le test à effectuer, l'ADN peut être stable entre 2 et 8°C jusqu'à dix jours.
- A l'arrivée au laboratoire, les écouvillons doivent être remis en suspension dans le milieu de transport conformément aux instructions du fabricant.
- Pour les tests ultérieurs, les prélèvements peuvent être soit congelés directement dans le milieu de transport et conservés à -70 °C soit préalablement centrifugés, dans ce dernier cas le traitement du culot d'ADN ou d'ARN devra être réalisé selon les recommandations du fabricant du test.
- Pour la réalisation des tests, les échantillons sont décongelés, centrifugés, puis traités de la même manière que les échantillons frais.
- Des milieux de transport prévus pour le test moléculaire peuvent contenir des détergents qui provoquent une lyse cellulaire qui sont importantes pour l'évaluation cytologique.

5.3 Synthèse des six recommandations identifiées

Au total, ces 6 recommandations identifiées préconisent un certain nombre de points à éviter ou à suivre aux différentes étapes de la phase pré-analytique pour que celle-ci soit réalisée dans de bonnes conditions.

5.3.1 Contextes cliniques à éviter

- Présence de sang menstruel, saignements.
- Inflammation ou infection vaginale.
- Rapports sexuels dans les 24 heures.
- Atrophie sévère des organes génitaux (ménopause).
- Grossesse, post-partum et allaitement.
- Irritation physique ou chimique : examen vaginal, crème ou liquide désinfectant, gel lubrifiant, médicaments vaginaux, douche vaginale ou gel spermicide (moins de 24 heures avant), colposcopie préalable avec l'acide acétique (moins de 24 heures avant), frottis (moins de 3 semaines avant), chirurgie cervicale (moins de 3 mois avant).
- Radiothérapie.

5.3.2 Site de prélèvement optimal

Zone de transformation qui se situe entre l'exocol (épithélium multicouche) et l'endocol (épithélium colonnaire).

5.3.3 Matériel de prélèvement

- Il n'est pas recommandé d'utiliser des spatules en bois ou des cotons-tiges.
- Les dispositifs de prélèvement doivent être soit en rayonne soit en polyester, trois différents types sont recommandés :
 - la brosse pour prélèvement cervico-vaginal de type Cervex-Brush® ;
 - la cytobrosse endocervicale ;
 - la spatule à extrémité allongée seule.

5.3.4 Techniques de prélèvement

- Avant de faire le frottis, le col doit être correctement exposé à l'aide d'un spéculum.
- Si nécessaire réaliser le FCU après traitement œstrogénique chez la femme ménopausée.
- Le prélèvement doit concerner la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol.
- Le choix d'un dispositif particulier dépend des variations dans la taille et la forme du col de l'utérus et de la situation clinique :
 - Une brosse endocervicale ne doit jamais être utilisée seule.
 - La brosse type Cervex Brush® est le plus approprié si la femme est enceinte ou que le col saigne facilement.
 - La combinaison de la cytobrosse et de la spatule offre un meilleur résultat si la jonction pavimento cylindrique est élevée (souvent post-ménopausique), après une opération du col ou s'il y a ectropion étendu de l'épithélium cylindrique.

5.3.5 Transport et conservation des prélèvements

- Le matériel de prélèvement doit être placé dans un milieu de transport tel que recommandé par le fabricant ou par le laboratoire qui effectue le test HPV.
- Les conditions de conservation, température et durée doivent être conformes aux instructions du fabricant du test HPV.
- Si les tests de détection ne sont pas réalisés à la suite, les prélèvements peuvent être soit congelés directement dans le milieu de transport et conservés à -70 °C soit préalablement centrifugés, dans ce dernier cas le traitement du culot d'ADN devra être réalisé selon les recommandations du fabricant du test.

6. Analyse des études sélectionnées

Vingt et une études ont été identifiées et analysées dans ce travail. Il s'agit principalement d'études d'échantillons prélevés sur des séries de patientes et qui recherchent à valider soit :

- une technique de réalisation du prélèvement : 3 études ;
- un site de prélèvement : 4 études ;
- une composition du milieu de transport : 5 études ;
- des conditions de conservation (durée et température) : 5 études ;
- un prélavage par l'acide acétique glacial : 2 études ;
- une technique d'extraction de l'ADN pour PCR : 4 études ;
- une technique d'extraction de l'ADN pour les tests d'hybridation : 3 études ;
- une modification des conditions de réalisation de la PCR : 2 études.

Chaque item évalué dans ce rapport a été traité dans très peu d'études (de 2 à 5 études) et plusieurs études évaluent plusieurs aspects à la fois (ce qui explique la différence entre le nombre total des études identifiées et la somme des études réparties par item).

6.1 Impact de la technique et du site de prélèvement sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV

Différentes techniques de prélèvement sont décrites dans les études, le plus souvent celui-ci est réalisé par rotation de 360° d'une cyto-brosse au niveau cervical comme dans les études de Depuydt (35) et Twu (36). Plusieurs rotations de 360° sont réalisées, leur nombre varie en fonction du type de cyto-brosse : 3 à 5 avec une cyto-brosse classique et 2 avec la Cervex Brush® Combi. En revanche, dans les études ayant comme unique objectif la recherche des HPV chez la femme sans cytologie, les prélèvements sont en général réalisés à l'aide d'un écouvillon (37,38).

6.1.1 Impact de la technique et du matériel utilisé pour le prélèvement sur la détection d'HPV

Trois études ont évalué l'impact de la technique de prélèvement sur la qualité des résultats de détection du génome et/ou de génotypage. Dans ces études les brosses utilisées de même que la technique de prélèvement sont différentes (cf. annexe 6, tableau 4). La principale limite de ces études est le nombre réduit de prélèvements HPV HR positifs.

L'étude de Depuydt *et al.* (35) a comparé les prélèvements réalisés au niveau cervical avec une brosse cervicale classique à ceux réalisés avec une brosse Rovers® Cervex Brush® Combi qui permet par introduction dans le canal endocervical de recueillir des cellules malpighiennes et des cellules endocervicales. Trois à cinq rotations de 360° ont été réalisées lors du prélèvement avec la cytobrosse classique et deux avec la Cervex Brush® Combi. Cette étude a été réalisée chez 100 patientes. Les deux types de brosses (200 brosses) ont été déchargés dans 10 mL de milieu SurePath®. Après centrifugation, les culots cellulaires ont été traités par protéinase K puis la charge virale HPV des 200 échantillons a été quantifiée par PCR en temps réel à l'aide de la technologie TaqMan®.

L'analyse cytologique des 200 échantillons n'a pas montré de différence dans le nombre de cellules malpighiennes recueillies (médiane des cellules malpighiennes/lame 54 963 (50 805-59 120) avec la brosse classique versus 54 595 (49 861-59 328) avec la Cervex Brush® combi. En revanche, pour les 100 échantillons recueillis à l'aide de la Cervex Brush® combi le nombre de cellules endocervicales est 2 à 3 fois plus élevé que celui recueilli avec la brosse classique (nombre médian de cellules endocervicales/lame 981 (740-1221) versus 371 (241-501)). La charge virale est également plus élevée avec la Cervex Brush® combi à 0.1825 copies/cellule versus 0.0042 copies/cellules avec la brosse classique (P = 0.02).

Par ailleurs, dans le groupe prélevé avec une brosse classique 60 % (3 des 5) frottis anormaux ont été trouvés positifs en HPV HR versus 66.7 % (6 des 9) avec la Cervex Brush® combi.

Les auteurs concluent à la supériorité de la brosse Cervex Brush® combi pour le recueil des cellules endocervicales et la quantification des HPV HR (35).

L'étude Krech *et al.* (37) a évalué l'impact de la nature de l'écouvillon lors d'un prélèvement vaginal (écouvillon floqué [Copan Italia, Brescia, Italy] comparé à un écouvillon avec embout en rayonne) chez 494 femmes asymptomatiques. Le prélèvement a été réalisé par un gynécologue. Cent dix neuf d'entre elles ont accepté en plus des 2 écouvillonnages vaginaux (à l'aide des deux types d'écouvillons), deux prélèvements cervicaux réalisées avec les 2 types d'écouvillons avec une rotation de 360°.

Parmi les 70 échantillons HPV HR positifs au niveau vaginal, 69 ont été recueillis avec l'écouvillon floqué [14 %], comparé à 37 [7,5 %] avec l'écouvillon en rayonne.

Parmi les 119 femmes ayant eu à la fois un prélèvement vaginal et un prélèvement cervical, 14 présentaient un résultat HPV HR positif pour au moins 2 des 4 écouvillons prélevés :

- ▶ 4 écouvillons HPV positifs pour 6 patientes ;
- ▶ 3 écouvillons HPV positifs pour 3 patientes ;
- ▶ 2 écouvillons HPV positifs pour 5 patientes.

Le géotypage HPV réalisé chez les 6 patientes dont les 4 échantillons étaient HPV HR positifs a montré une concordance totale des types HPV pour les prélèvements vaginaux avec les 2 types d'écouvillons. Par contre, une différence a été observée avec les prélèvements cervicaux chez 2 des 6 patientes avec pour l'une la détection des géotypes 33 et 51 à l'aide de l'écouvillon flocké et des géotypes 33, 51 et 61 à l'aide de l'écouvillon en rayonne et pour l'autre la détection des géotypes 16, 56, 58, 61 et 71 à l'aide de l'écouvillon flocké et des géotypes 16, 53, 56, 58, 61 et 71 avec l'écouvillon en rayonne.

Si les résultats de cette étude montrent, pour les prélèvements vaginaux, une meilleure détection d'HPV avec l'écouvillon floqué, pour les prélèvements cervicaux le faible nombre d'échantillons HPV HR positifs, ne permet pas de comparer de façon significative les résultats obtenus avec les deux types d'écouvillons. Seule une différence de géotypes est retrouvée au niveau cervical avec les deux écouvillons, celle-ci n'est décelée que sur deux patientes qui de plus sont multi-infectées. Cette différence est expliquée par les auteurs par des différences liées au prélèvement.

L'étude de Harper *et al.* (38) avait pour objectif d'étudier entre autres l'impact de la technique de prélèvement sur la détection des HPV. Dans cette étude, 3 techniques d'auto-prélèvement vaginal ont été comparées (2 prélèvements consécutifs avec un écouvillon en dacron, un seul prélèvement à l'aide d'un écouvillon en dacron, un prélèvement à l'aide d'un tampon). Ces prélèvements ont été répétés trois fois sur une période de 4 à 6 semaines. De plus, un prélèvement (ectocervical et endocervical) était réalisé par un médecin au moment de l'inclusion dans l'étude. Les patientes de cette étude âgées de 18 à 68 ans, étaient toutes en attente de colposcopie pour anomalies cytologiques ou anomalies visibles au niveau du col. Au total, 14 prélèvements étaient programmés par patiente (à l'inclusion, un prélèvement cervical (ecto et endocol) réalisé à l'aide d'un écouvillon en dacron par un médecin et un auto-prélèvement vaginal (à l'aide d'un écouvillon en dacron, de 2 écouvillons en dacron et d'un tampon puis trois auto-prélèvements réalisés à domicile selon les mêmes conditions). Au total, 1189 prélèvements cervico-vaginaux ont pu être obtenus chez les 103 patientes incluses. Les prélèvements ont été déchargés dans du milieu PreserCyt et conservés à température ambiante. La détection des HPV a été effectuée par PCR MY09-MY11-HMB01 L1 consensus suivi d'un blot (Roche).

Au moins un des 14 prélèvements était positif en HPV HR chez 45 patientes (43.7%) et aucun prélèvement n'était positif chez 51 patientes (49.5 %). Parmi les 7 patientes restantes, une n'a fourni qu'un échantillon à la quatrième semaine et 6 autres n'ont fourni aucun prélèvement.

La détection d'HPV à l'aide d'un seul écouvillon vaginal ou d'un tampon, détecte 10 à 35 % de moins d'HPV HR que le prélèvement vaginal réalisé avec 2 écouvillons consécutifs ($p < 0.025$). La détection avec le tampon reste inférieure au prélèvement à l'aide d'un ou 2 écouvillons vaginaux. Les auteurs expliquent cette différence par le recueil d'un nombre de cellules très important avec le tampon qui inhiberait la PCR. Les auteurs concluent que la détection des HPV est indépendante du cycle menstruel et du moment de prélèvement. Par contre, elle est dépendante de la technique de prélèvement (38).

Au vu des résultats présentés dans ces trois études, la technique de prélèvement ainsi que le matériel utilisé (cytobrosse, brosses type Cervex Brush®, nombre de rotations, nature de l'écouvillon, nombre d'écouvillons utilisés par prélèvement...) semble avoir un impact sur le nombre de cellules recueillies ainsi que sur la détection des HPV. Mais le faible nombre d'échantillons positifs HPV HR testés dans les études ne permet pas de le démontrer de façon formelle.

6.1.2 Impact du site de prélèvement sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV et sur les génotypes retrouvés

Quatre études se sont intéressées au taux de détection de l'HPV et à la répartition des génotypes en fonction des sites de prélèvement.

Étude de Krech *et al.* (37) décrite précédemment a comparé la détection d'HPV HR au niveau vaginal et cervical chez 119 patientes. Pour les 105 patientes HPV négatives, la concordance vaginal/cervical était de 100 % [105/105]. Pour les 14 patientes HPV positives :

- ▶ 4 écouvillons HPV positifs pour 6 patientes ;
- ▶ 3 écouvillons HPV positifs pour 3 patientes ;
- ▶ 2 écouvillons HPV positifs pour 5 patientes.

La concordance vaginal/cervical pour les patientes HPV positives est de 64,3 % [9/14], la concordance totale HPV négatifs et HPV positifs est de 95,8 % [114/119]. Le génotypage a été réalisé chez les 6 patientes dont les 4 échantillons (2 cervicaux et 2 vaginaux) étaient HPV HR positifs. Bien que le nombre de types d'HPV retrouvé au niveau cervical chez ces 6 patientes soit plutôt inférieur à celui retrouvé au niveau vaginal, la différence n'est pas significative.

Cette étude est limitée par le très faible nombre de patientes HPV positives et par le fait que les données ne sont pas montrées pour 3 prélèvements (un vaginal et 2 cervicaux) (37).

Étude de Roberts (39), l'objectif était de rechercher le site de prélèvement le plus fiable et le plus précis, au niveau du tractus génital, pour la détection de l'ADN HPV. La comparaison de la détection d'HPV a été réalisée dans le cadre d'une étude prospective de 898 femmes âgées de 16 à 24 ans, conduite sur 4 ans, entre 3 sites différents de prélèvement :

- ▶ prélèvement réalisé avec un écouvillon en dacron introduit dans le col (une à deux rotations) ;
- ▶ prélèvement réalisé avec un écouvillon en dacron frotté au niveau labial/vulve/périnée ;
- ▶ lavage vaginal avec 10 mL de sérum physiologique.

Au final, 232 patientes ont été trouvées HPV HR positives pour les types HPV 6, HPV11, HPV16 ou HPV18. Dans cette population, la prévalence des différents types d'HPV est indiquée en annexe 6, tableau 5.

Bien que la plupart des patientes HPV positives soient infectées au niveau des 3 sites de prélèvement (cf. tableau 5, page suivante), les HPV HR ne sont retrouvés que dans un seul des 3 sites de prélèvement pour un pourcentage non négligeable de patientes. Il s'agit de :

- ▶ 13 patientes trouvées positives HPV6 : 12 patientes pour le site labial/vulve/périnée et 1 patiente pour le lavage vaginal.
- ▶ 3 patientes trouvées positives HPV11 : 1 patiente pour le site labial/vulve/périnée, 1 pour le lavage vaginal et 1 pour le prélèvement cervical.
- ▶ 22 patientes trouvées HPV16 positives : 15 patientes pour le site labial/vulve/périnée, 3 patientes pour le lavage vaginal et 4 patientes pour le prélèvement cervical.
- ▶ 11 patientes trouvées positives HPV18 : 8 patientes pour site labial/vulve/périnée, 2 patientes pour le lavage vaginal et 1 patiente pour le prélèvement cervical.

La comparaison deux à deux de la détection des types HPV 6, 11, 16 et 18 a été réalisée (site labial/vulve/périnée versus lavage vaginal, prélèvement cervical versus lavage vaginal et site labial/vulve/périnée versus du prélèvement cervical). Aucune différence statistiquement significative n'est relevée entre les différents sites de prélèvement pour les génotypes HPV11, HPV16 et HPV18. En revanche, la prévalence d'HPV6 est significativement plus élevée au niveau des échantillons labial / vulve / périnée comparé aux prélèvements cervicaux ($p=0.0008$) ou aux lavages vaginaux $p=0.0095$. Les auteurs concluent que cette différence ne peut s'expliquer que par une mauvaise intégrité de l'ADN ou par une inhibition spécifique de l'amplification, puisque chaque échantillon était positif pour le gène de la β -globine. Elle peut être due probablement au fait que la zone de prélèvement labial / vulve / périnée est plus grande et par la présence de verrues au niveau de ce site.

Par ailleurs, dans cette étude, il a été observé que la combinaison des résultats des écouvillons des 3 sites augmentait la détection des HPV6, HPV11, HPV16, HPV 18 à 98,7 %, 90,0 %, 97,9 %, et 96,9 % respectivement. Les auteurs en concluent qu'un lavage vaginal ou un écouvillonnage de la région labium/vulve/périnée peut être réalisé pour la recherche d'HPV lorsque la biopsie cervicale n'est pas possible (39).

Tableau 5. Prévalence des différents types HPV en fonction des sites de prélèvements.

Patientes / Sites de prélèvement	Types d'HPV			
	HPV6	HPV 11	HPV 16	HPV 18
Nombre de patientes HPV positives (% prévalence)	81 (9 %)	10 (1.1 %)	147 (16.4 %)	64 (7.1 %)
Patientes positives au niveau des 3 sites de prélèvement (%)	57 (70,4)	4 (40.0)	96 (65.3)	41 (64.1)
Patientes positives au niveau de 2 sites de prélèvement (%)	11 (13.6)	3 (30.0)	29 (19.7)	12 (18,8)
Patientes positives au niveau d' 1 seul site de prélèvement (%)	13 (16.0)	3 (30.0)	22 (15.0)	11 (17.2)
-labium/vulve/périnée	12 (92,3)	1 (33,3)	15 (68,2)	8 (72,7)
-endo/ecto cervical	0 (0,0)	1 (33,3)	4 (18,2)	1 (9,1)
-lavage cervicovaginal	1(7,7)	1 (33,3)	3 (13,6)	2 (18,2)

Étude de Twu *et al.* (36) l'objectif était de comparer le taux de détection ainsi que les types d'HPV retrouvés au niveau vaginal et cervical chez 252 femmes d'âge médian de 42 ans (26 à 79 ans) ayant une indication de colposcopie. Le prélèvement cervical a été réalisé par un médecin à l'aide de la Spatule d'Ayre et d'une brosse (3 à 5 rotations 360°). Un auto prélèvement vaginal était réalisé en plus à l'aide d'une cytobrosse.

Le taux d'infection retrouvé était de 24,7 % à partir des échantillons vaginaux et 30,2 % à partir des échantillons cervicaux, avec une concordance vaginal/cervical $\kappa = 0,37$, IC 95 %, 0,25 -0,50 ($P = 0,39$). Au moins 2 types d'HPV ont été détectés dans les prélèvements vaginaux pour 14 femmes (5,6 %) et dans les échantillons cervicaux pour 15 femmes (6,0 %) (Concordance $\kappa^{35} = 0,30$, IC 95 %, de 0,07 à 0,54, $P = 0,82$).

³⁵ Cf. Définition du coefficient Kappa en annexe 3.

Au total, 23 géotypes différents d'HPV ont été détectés dans les prélèvements vaginaux et 22 dans les échantillons cervicaux.

Pour les HPV HR : ils sont moins bien détectés dans les prélèvements vaginaux que dans les prélèvements cervicaux (15,9 % des échantillons vaginaux vs 23,8 % des cervicaux $p = 0,01$), HPV 52 était le type le plus couramment retrouvé, il a été plus souvent détecté dans les échantillons cervicaux que vaginaux 10,3 % vs 6,3 % ($p = 0,03$). HPV 16 était le deuxième type le plus fréquemment retrouvé, il a été plus souvent détecté dans les échantillons cervicaux que vaginaux 5,6 % vs 4,4 % mais la différence n'est pas significative. Pour tout autre type HPV HR il n'y a aucune différence de détection entre le site de prélèvement vaginal ou cervical.

Pour les HPV non oncogènes, la prévalence n'est pas significativement différente entre les prélèvements vaginaux (18,3 %) et cervicaux (15,1 % ; $P = 0,31$), sauf pour HPV 32 ($P = 0,04$).

Par ailleurs, afin d'évaluer la capacité du test à détecter les HPV en fonction du grade histologique des lésions, le taux d'HPV positifs (sur prélèvements vaginaux et cervicaux) a été observé en parallèle avec les résultats histologiques. Ainsi avec le test HPV respectivement pour les prélèvements vaginaux et cervicaux, l'HPV a été détecté dans 23,4 % et 24,8 % des échantillons normaux, 33,3 % et 44,4 % des lésions C1N1, 71,4 % et 85,7 % des lésions CIN3 et 100 % et 100 % des carcinomes cellulaires squameux.

En conclusion, quel que soit le site de prélèvement (cervical ou vaginal), aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence pour les échantillons normaux, les lésions de grades CIN1, CIN3 et les CCS ($p=0,48-0,69$). Que ce soit pour les échantillons cervicaux ($p<0,0001$) ou vaginaux ($p<0,0001$) le taux d'HPV détecté augmente avec la sévérité de la lésion histologique.

Étude Harper et al. (38) décrite précédemment (cf. 4.1.1). Les résultats montrent que l'auto-prélèvement vaginal détecte 8 % de moins d'échantillons HPV positifs que le prélèvement cervical réalisé par le médecin sauf lorsque l'auto-prélèvement est réalisé à l'aide de 2 écouvillons consécutifs (OR= 0.87 pour 2 écouvillons consécutifs $p=NS$, OR= 0.71 auto prélèvement avec un écouvillon ($p=0.023$), OR=0.66 pour le prélèvement à l'aide du tampon ($p=0.009$). Les auteurs concluent que l'auto-prélèvement vaginal à l'aide de 2 écouvillons vaginaux consécutifs pourrait être une alternative au prélèvement cervical réalisé par un médecin pour la détection des HPV.

Concernant le taux de détection d'HPV en fonction du site de prélèvement :

- La comparaison du taux de détection des différents sites de prélèvements (cervicaux, vaginaux, labial/vulvaire/périnée) dans les différentes études retrouve le plus souvent une très bonne concordance sauf dans l'étude de Twu (36).
- Dans les lésions CIN 3, la détection des HPV HR semblerait être plus importante dans les prélèvements cervicaux (87,5 % versus 75,0 %) comparés aux prélèvements vaginaux, mais la différence n'est pas significative (36,39).
- Bien que le prélèvement réalisé au niveau du col demeure la référence (38), l'intérêt du prélèvement vaginal pour la recherche d'HPV est qu'il permet l'exploration d'une plus grande surface d'épithélium, comparé au prélèvement cervical, ce qui permettrait de recueillir plus facilement les HPV et expliquerait la concordance retrouvée. Certains auteurs proposent donc le lavage vaginal, l'écouvillonnage de la région labium/vulve/périnée ou l'écouvillonnage vaginal pour la recherche d'HPV lorsque le prélèvement cervical n'est pas possible (38,39).

Concernant la répartition cartographique des génotypes en fonction du site de prélèvement :

- Des différences sont retrouvées au niveau de la cartographie de certains génotypes, avec une plus grande prévalence du type 6 et 32 dans les prélèvements vaginaux (39) qui s'explique probablement par la présence de verrues et une plus grande prévalence des HPV 52 et 16 dans les échantillons cervicaux (36)

6.2 Impact de la nature et de la composition du milieu de transport sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV

Le fabricant de chaque test de détection/génotypage des HPV décrit, dans sa notice d'utilisation, le ou les milieux de transport cellulaire avec lesquels il est validé. Un milieu de transport peut également être « validé » pour une technique de détection/génotypage à la suite d'expériences réalisées dans un laboratoire et publiées dans une revue scientifique. Parmi les 5 études décrites dans ce chapitre, 4 correspondent à des études de validation de milieux de conservation avec un test de détection et/ou génotypage donné (3 sur 4 décrivent la validation du milieu avec le test HC2). Une seule étude rapporte l'impact négatif de l'utilisation du milieu PapSpin® avec la PCR.

6.2.1 Évaluation d'un milieu rince bouche pour les 2 kits Linear Array HPV genotyping test (amorces consensus PGMY09/11 L1) et AMPLICOR MWP (Roche)

L'étude de Castle *et al.* (40) a comparé la détection de l'ADN HPV à partir de deux écouvillons en dacron prélevés au niveau cervical chez 32 femmes dont un a été placé dans du milieu PreservCyt (Cytyc Corp, Marlborough, MA) et l'autre dans un liquide rince bouche (Scope, Proctor and Gamble, Cincinnati, OH) qui contient du chlorure de cetylpyridinium, du benzoate de sodium et 20 % d'éthanol. Les échantillons ont été conservés à température ambiante pendant moins de 3h puis réfrigérés à 5°C jusqu'à expédition. L'ADN HPV a été extrait à partir d'un aliquot de chaque échantillon à l'aide du kit QIAamp MinElute Media (Qiagen, Inc., Valencia, CA) et la détection HPV a été réalisée par 2 kits commerciaux Linear Array HPV genotyping test (amorces consensus PGMY09/11 L1) (Roche Molecular Systems, Alameda, CA) et AMPLICOR MWP (Roche). La comparaison des échantillons a été réalisée à J0, J21 et J42 de conservation. Une comparaison des résultats du test HC2 a également été réalisée après 4 mois de conservation (à partir de 34 échantillons résiduels en milieu PreservCyt et 21 échantillons résiduels dans le milieu rince bouche). Le diagnostic histologique était CIN3 pour deux patientes et 3 CIN2 pour 3 patientes.

La concordance des résultats obtenus à partir des 2 milieux par le test AMPLICOR MWP était $\geq 94\%$ avec $\kappa \geq 0,88$. La concordance des 37 génotypes recherchés par le test Linear Array HPV genotyping en les classant par risque d'induire un cancer (non carcinogène, carcinogène, HPV 18, HPV16, HPV HR autres que 16 et 18) était globalement $\geq 74\%$ (79 % à J0, 74 % à J21 et 76 % à J42). La corrélation avec le test HC2 après 4 mois de conservation était élevée (coefficient de Spearman= 0,91) et la concordance de 88 % ($\kappa=0,77$, $p=0,6$) (40).

Pour les échantillons CIN 3 tous les résultats étaient positifs par le test AMPLICOR MWP à J0, J21 et J42 de conservation à partir des deux milieux de transport et par le test HC2. Les génotypes retrouvés étaient HPV 31 pour une des patientes (même résultat avec les deux milieux de transport) et HPV 16 et 42 pour la deuxième (différence cependant retrouvée entre les deux milieux de transport avec détection des types 16 et 42 à partir du milieu PreservCyt et uniquement du type 16 à partir du liquide rince bouche).

Pour les 3 patientes dont le diagnostic histologique était CIN2, le génotype 16 a été retrouvé pour l'une d'entre elles quel que soit le milieu et la durée de conservation. Pour la deuxième patiente les types 42, 81, 84 et 89 ont été retrouvés à partir du liquide rince bouche aux trois périodes de conservation alors que du type HPV52 n'a été retrouvé qu'à partir du milieu PreservCyt et uniquement à J0. Enfin pour la troisième patiente les types HPV 31 et 66 ont été retrouvés à partir du liquide rince bouche uniquement à 42 jours de conservation alors qu'ils étaient retrouvés à J0, à 21 et 42 jours à partir du milieu PreservCyt.

La comparaison avec la technique HC2 montrait des résultats variables, une patiente présentant un résultat positif à partir du liquide rince bouche et négatif à partir du milieu PreservCyt, une autre présentant un résultat positif à partir des deux milieux et une troisième présentant un résultat né-

gatif à partir des deux milieux. Les auteurs expliquent ces discordances par le fait que les lésions CIN2 sont très limitées et associées à une charge virale faible.

Les auteurs concluent que les résultats obtenus à partir du milieu PreservCyt (Cytoc Corp, Marlborough, MA) ou du liquide rince bouche sont tout à fait comparables. Les deux tests PCR ne semblent par ailleurs pas être affectés par la durée de conservation. Une bonne concordance est retrouvée après quatre mois de conservation avec le test HC2. Les auteurs suggèrent que le liquide rince bouche, peu coûteux, non inflammable puisse être utilisé pour des programmes de dépistage HPV.

Cette étude reste cependant réalisée sur un très petit échantillon de patientes dont cinq seulement présentent des lésions CIN 2-3 et la comparaison avec le test HC2 n'a été réalisée que pour 21 échantillons prélevés dans du milieu rince bouche (40).

6.2.2 Évaluation du milieu UCM pour le test HC2

L'étude de Taha *et al* (41) a comparé la recherche d' HPV par Hybrid Capture II à partir d'échantillons collectés dans du milieu Universal collection medium (UCM) avec le milieu de transport Digene (STM). Trois séries de prélèvements exocol -endocol ont été effectuées chez 893 femmes adressées pour coloscopie mais dont le statut histologique n'est pas décrit dans l'étude.

- ▶ Un frottis conventionnel réalisé avec la spatule en bois d'Ayre et la brosse accompagnant le kit STM déchargé dans le milieu STM.
- ▶ Un frottis liquide dans 1 mL de milieu de transport UCM à l'aide d'une deuxième brosse.
- ▶ Un frottis liquide dans 1 mL de milieu de transport STM réalisé avec la même brosse que le prélèvement conventionnel.

La détection d'HPV HR était de 29,9 % (267/893) pour les brosses prélevées dans du milieu STM et de 29,6 % dans le milieu UCM (264/893). La corrélation est excellente entre les 2 milieux de transport ($\kappa = 0,92$, $r^2=0,92$). Cependant, une discordance a été retrouvée pour 14 échantillons positifs dans le milieu UCM et négatifs en milieu STM et pour 17 échantillons positifs dans le milieu STM et négatifs dans le milieu UCM (41)

6.2.3 Évaluation du Milieu Novaprep® pour le test de détection HC2 et le test de génotypage Inno-Lipa

L'étude de Pretet, (42) a comparé le milieu Novaprep® (NVT) (Novacyt, Vélizy-Villacoublay, France) avec le milieu STM considéré comme milieu de référence (Qiagen) pour la détection HPV HR pour le test HC2 et le génotypage Inno-Lipa

Il s'agit d'une étude multicentrique ayant recruté 134 patientes adressées soit pour frottis de dépistage soit pour coloscopie. Le statut histologique a été classé normal pour 7 femmes, métaplasie pour une, condylomes pour 2, CIN1 pour 12, CIN2 pour 29, CIN3 pour 26, cancer pour une et inconnu pour 21.

Les échantillons cervicaux prélevés en milieu NVT ont été centrifugés 5 min à 1000 g à température ambiante. Les culots cellulaires ont été lavés dans 1 mL de PBS puis remis en suspension dans 200 μ L de milieu STM et 100 μ L de solution de dénaturation puis incubés à 65°C pendant 90 min en vue de la détection par le test HC2.

Cent trente et une comparaisons ont pu être réalisées par le test HC2. Le taux de détection HPV HR était de 72 % avec NVT vs 82 % avec STM soit un taux de concordance de 87 % ($\kappa = 0,63$).

Après étude cytologique des lames, 32 échantillons ont été classés non satisfaisants en raison d'une cellularité insuffisante (≤ 5000 cellules/lame). Au final 99 paires possédaient une cellularité suffisante et ont pu être comparées (6 sans lésion intra-épithéliale, 11 ASC-US, 29 LSIL, 42 HSIL, 9 ASC-H, 2 inconnus). Le taux de positivité HPV a été trouvé à 84 % (83/99). La concordance entre les deux milieux est de 94 % ($\kappa = 0,78$). Douze échantillons (6 paires) présentent des discordances et 11 ont pu être génotypés (3 paires HC2 négatives avec le milieu NVP et positives avec

le milieu STM et 3 autres paires HC2 positives avec le milieu NVP et négatives avec le milieu STM). Des différences sont observées pour les 5 paires dont les résultats des génotypes obtenus à partir des 2 milieux (NVT /STM) :

- paire 1 :16 & 31/16 ;
- paire 2 :16 & 52/16 ;
- paire 4 : 52/51 & 52 ;
- paire 5 : 31 & 51/31 & 33 ;
- paire 4 : 56/51.

Globalement, en considérant les échantillons détectés positifs par HC2 et par Inno-Lipa, la concordance entre les deux milieux est de 99 % ($\kappa = 0,97$).

L'étude a également évalué le taux de positivité avec le test HC2 en prenant en compte le milieu, la cytologie et l'histologie. Il n'y a pas de différence en fonction du milieu dans le taux de positivité HC2-NVT et HC2-STM pour les échantillons LSIL et HSIL (détection 80 % CIN1, 93 % CIN2 et 100 % CIN3) (42).

6.2.4 Évaluation du Milieu Easyfix® pour le test de détection HC2

L'étude de Leduc et al. (43), avait pour objectif d'évaluer le milieu de conservation cellulaire Easyfix® pour la détection d'ADN HPV oncogène par la méthode HC2. Cette étude a été réalisée chez 256 femmes (114 lésions de type ASC-US, 122 bas grade, 19 haut grade et 1 cas d'atypie des cellules glandulaires). Elle a comparé des prélèvements réalisés à l'aide d'une brosse Cervex-Brush et déchargés dans du milieu de transport Easyfix® (E) avec un deuxième prélèvement réalisé en parallèle au moyen du kit Cervical Sampler™ (C) fourni par la société Digene.

La comparaison des résultats des tests HPV réalisés sur les deux milieux montre une concordance pour 215 cas (121 HPV/E+ et HPV/C+, 94 HPV/E- et HPV/C-) et une discordance pour 41 cas (26 HPV/E- et HPV/C+, 15 HPV/E+ et HPV/C-). La concordance moyenne entre les deux méthodes est significative ($\kappa=0,74$). De même le χ^2 (2,44) confirme l'absence d'anomalie statistique de répartition des discordances. Parmi les 24 patientes ayant bénéficié d'une biopsie, le test HPV oncogène a été négatif dans 13 prélèvements en milieu Easyfix® et dans 11 prélèvements en milieu Cervical Sampler™. Parmi les frottis ASC-US, 15 cas sont concordants négatifs (HPV/C- et HPV/E-) et 15 cas sont concordants positifs (HPV/C+ et HPV/E+). À l'inverse, 5 cas sont discordants avec 2 cas HPV/C- et HPV/E+ et 3 cas HPV/C+ et HPV/E-. La concordance moyenne entre les deux méthodes est significative ($\kappa = 0,76$). Le χ^2 est non significatif.

Le test HPV réalisé sur milieu Easyfix® a une bonne sensibilité puisqu'il a permis de retrouver un HPV HR dans 76,3 % des cas de lésions au moins de bas grade. Comparativement, le même test en milieu Cervical Sampler™ a une sensibilité de 76,5 %. Le milieu Easyfix®, a permis de détecter l'HPV HR dans 100 % des lésions de haut grade, dans 75,2 % des lésions de bas grade, dans 49,9 % des lésions ASC-US et dans 28,7 % des cas sans anomalies cytologiques. Quarante et un cas se sont révélés discordants, mais l'interprétation est délicate car il pourrait s'agir d'un défaut de qualité des échantillons testés (sur les 33 cas qui ont pu être étudiés, 8 ont montré une quantité d'ADN β -globine très faible) ou correspondre à des valeurs de RLU proches du seuil de positivité.

Les auteurs ont conclu que cette étude a démontré la fiabilité de la recherche d'HPV par Hybrid Capture® sur milieu Easyfix® (43).

6.2.5 Évaluation du milieu PapSpin® et comparaison avec du PBS pour une détection par PCR

L'étude de Gudleviciene et al. (44) avait pour objectif d'évaluer le milieu Shandon PapSpin™ (Thermo Shandon, Pittsburg, Pennsylvanie, USA) pour la détection des HPV HR par une PCR utilisant les amorces consensus MY09 / MY11.

L'étude a inclus 2495 femmes adressées pour dépistage HPV. Le prélèvement a été réalisé à l'aide d'un kit comprenant une brosse Wallach Papette déchargée dans du milieu de transport

PapSpin. Des lésions cytologiques ont été détectés chez 160 femmes soit 6,4 % (ASC-US pour 42 femmes (26 %), ASC-H (HSIL suspicion) pour 6 (4 %), AGUS pour 3 (2 %), LSIL (CIN 1) pour 51 (32 %), HSIL (CINII / CINIII) pour 55 (34 %)). Tous les échantillons ont été conservés à -20°C avant d'être testés pour la recherche d'HPV. Il ne s'agit pas réellement d'une étude cas-contrôle mais 16 femmes ont été choisies au hasard ont et été re-testées en HPV en tant que contrôle de qualité interne. Les résultats obtenus avec le milieu PapSpin® ont été comparés à des échantillons contrôle frais prélevés avec le même type de brosses et déchargés dans du PBS. Tous les échantillons ont été conservés à -20°C avant d'être testés pour la recherche d'HPV. La détection des HPV HR a été réalisée par PCR utilisant les amorces consensus MY09 / MY11.

Le matériel cellulaire prélevé dans du liquide PapSpin® a été lavé dans un tampon PBS (pH = 7,4) puis l'extraction a été réalisée à l'aide des colonnes (SorpoClean TM génomique ADN Extracion module, Sorpo Diagnostics) selon le protocole du fabricant. La quantité d'ADN extraite a été mesurée par un BioPhotometer.

Concentration d'ADN extrait

Une différence significative de concentration d'ADN, 6 fois inférieure, est retrouvée entre les échantillons prélevés en milieu PapSpin et les contrôles en PBS (11,1 pg/mL et 67,5 pg/mL, respectivement, $p < 0,0001$).

Détection des HPV

Avec le milieu PapSpin™, 5,6 % (9/160) échantillons étaient HPV positifs contre 50 % (8/16) pour les contrôles PBS ($p < 0,000001$). Il faut noter par ailleurs que tous les contrôles identifiés HPV positifs avec le PBS étaient négatifs avec le milieu PapSpin® (3 échantillons de contrôles positifs ont été classés LSIL, 3 HSIL et 2 ASC-H).

Les auteurs ont conclu que l'utilisation du milieu PapSpin® impacte négativement la détection de l'ADN HPV. La détection HPV est 8,9 fois plus fréquente à partir des contrôles en PBS (44).

La comparaison de la détection d'HPV HR avec le même test de détection (HC2) mais à partir d'échantillons prélevés dans des milieux de transport différents a montré pour les 4 premières études, une concordance globale de 84 à 89 % avec cependant quelques discordances entre les positifs et/ou les négatifs, pour les différents milieux comparés.

L'étude de Castle *et al.* (40) a comparé la détection de l'ADN HPV par Linear Array HPV genotyping test et AMPLICOR MWP chez 32 femmes, dont le frottis a été déchargé dans un milieu PreservCyt® ou dans un liquide rince bouche Scope®. Des différences dans les génotypes détectés ont été observées pour 5 patientes classées CIN2 ou 3. La comparaison entre les deux milieux avec la technique HC2 après 4 mois de conservation a montré des résultats variables.

L'étude de Taha *et al.* (41) a comparé chez 893 femmes la recherche d'HPV par HC2 à partir d'échantillons collectés dans du milieu Universal collection medium (UCM) et dans du milieu de transport Digene (STM). Une discordance a été retrouvée pour 14 échantillons positifs dans le milieu UCM et négatifs en milieu STM et pour 17 échantillons positifs dans le milieu STM et négatifs dans le milieu UCM.

L'étude de Pretet *et al.* (42) a comparé le milieu Novaprep® avec le milieu STM® considéré comme le milieu de référence pour la détection HPV HR par le test HC2 et le génotypage Inno-Lipa chez 134 patientes. Des différences concernant les génotypes viraux détectés ont été observées pour 5 des 99 paires comparées.

L'étude de Leduc *et al.* (43) a comparé la recherche d'HPV chez 256 femmes par la méthode HC2 à partir d'échantillons déchargés dans du milieu Easyfix® (E) ou dans du milieu Cervical Sampler®. Une discordance a été retrouvée pour 41 cas (26 HPV/E- et HPV/C+, 15 HPV/E+ et HPV/C-). Parmi les frottis ASC-US, 5 cas sont discordants avec 2 cas HPV/C- et HPV/E+ et 3 cas HPV/C+ et HPV/E-.

Enfin, l'étude de Z Gudlevuciene *et al.* (44) qui utilisait une détection par PCR utilisant les amorces consensus MY09 / MY11, a montré que l'utilisation du milieu PapSpin® impactait négativement la détection de l'ADN HPV par rapport à un recueil en PBS. Une différence significative 6 fois supérieure de concentration d'ADN est retrouvée entre les contrôles en PBS et les échantillons prélevés en milieu PapSpin®. La détection d'HPV est 8,9 fois plus fréquente dans les contrôles PBS que les échantillons dans du milieu PapSpin®.

6.3 Comparaison des prélèvements cervicaux recueillis dans un milieu transport versus écouvillons secs

Une seule étude (45), a comparé, chez 135 patientes, les prélèvements cervicaux recueillis sur écouvillons secs et conservés à température ambiante à ceux recueillis dans du milieu de transport (STM).

L'étude a été réalisée sur 135 patientes dont 73 en attente de coloscopie (2 avec cytologie insuffisante, 2 avec cytologie normale, 17 ASC-US, 43 LSIL, 3 HSIL et 6 cancers) et 62 patientes avec prélèvement à cytologie normale prélevées dans le cadre d'un suivi régulier. L'âge moyen des patientes est de 38,2 ans (\pm 11,5) pour le groupe coloscopie et de 44,4 ans (\pm 11,4) pour le groupe suivi.

La recherche d'HPV a été effectuée par PCR sur le gène L1 (amorces PGMY09/PGMY11/HMB01) suivie d'une hybridation dot-blot. Parallèlement, le gène de la β -globine a été amplifié à l'aide des primers PC04/GH20. La détermination et la quantification du type viral a été réalisée par PCR Taqman spécifique des génotypes 6, 16, 18, 39, 52, 63, 66 (gène E7) et par quantification du gène de la β -actine. La quantification relative (RQ) sur écouvillons secs variait de 0,75 à 3,25 pour la β -actine et de 0,69 à 5,31 pour HPV 16.

Les résultats ont montré que seulement 0,7 % des échantillons prélevés en milieu STM présentaient une quantité insuffisante de cellules contre 6,7 % des écouvillons secs ($p < 0,01$). En milieu STM, 31/134 des échantillons ayant une cellularité suffisante (soit 23.1 %) étaient HPV HR positifs vs 31/126 (24.6 %) pour les échantillons secs à cellularité suffisante. Parmi les 125 paires comparables, 25 échantillons étaient positifs pour les 2 types de prélèvements, 6 étaient positifs en milieu STM mais pas sur écouvillon sec et 5 positifs en milieu sec mais pas en STM. Enfin, 89 étaient négatifs pour les 2 types de prélèvements. La concordance entre le milieu STM et l'écouvillon sec pour les HPV HR positifs est de 34/56 soit 60.7 % (κ : 0.69 ; 95 % intervalle de confiance [CI], 0.53 à 0.82). Chez les 9 patientes présentant un diagnostic cytologique de type HSIL ou de cancer invasif du col, les HPV HR ont été détectés chez 7 d'entre elles à partir du milieu STM et 7 à partir des écouvillons secs. La sensibilité de détection des HPV HR est identique entre les prélèvements recueillis en milieu STM et ceux réalisés à l'aide écouvillons secs lorsqu'il existe des lésions cliniques de type HSIL et cancer.

Tableau 6. Résultats des types d'HPV détectés à partir de prélèvements réalisés à l'aide d'écouvillons secs ou en milieu STM chez 9 patientes présentant un diagnostic cytologique de type HSIL ou Cancer.

Patientes	Diagnostics cytologique	Types HPV STM	Types HPV Ecouvillons secs
1	HSIL	16, 42	16, 42
2	HSIL	70	Non typable
3	HSIL	16, 39, 53, 55, 62, 39	16, 39, 53, 55, 81
4	CANCER	40, 53, 56, 71	40, 53, 56, 71
5	CANCER	69	Non typable
6	CANCER	16	16
7	CANCER	53	45, 53
8	CANCER	Quantité insuffisante	16
9	CANCER	Négatif	

Par ailleurs, afin d'évaluer l'étendue de la dégradation de l'ADN sur écouvillons secs, la β -actine a été quantifiée en même temps que l'HPV DNA. La quantification du gène de l'actine était 20 fois plus faible à partir des écouvillons secs qu'à partir du milieu STM ($p < 0,001$) alors que la charge

virale HPV DNA était seulement de 1.6 fois plus faible à partir des écouvillons secs par rapport au milieu STM ($p=0,013$).

Selon les auteurs, l'utilisation d'écouvillons secs conservés à température ambiante augmente le nombre de prélèvements contenant une quantité insuffisante de cellules et diminue le taux de détection d'HPV. La différence de dégradation de l'ADN génomique qui est nettement plus importante que pour l'ADN HPV³⁶ s'explique par le fait que l'ADN HPV est présent sous forme épisomale (45).

Les auteurs proposent des études complémentaires afin d'identifier des méthodes permettant d'inactiver les nucléases dans les échantillons cliniques et de préserver l'ADN génomique dans les prélèvements réalisés à l'aide d'écouvillons secs. Enfin, ils concluent que la recherche d'HPV peut être réalisée à partir d'écouvillons secs conservés à température ambiante mais que cela affecte la cellularité des échantillons et la sensibilité de la détection (45).

6.4 Impact d'un prélavage par l'acide acétique glacial sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV

L'étude de Feng *et al.* (46), a évalué l'impact d'un traitement préalable par l'acide acétique glacial sur la détection d'HPV par le test HC2 sur 120 échantillons prélevés en milieu PreservCyt® et contenant ou non du sang. Les prélèvements ont été séparés en 2 fractions : une fraction lavée par une solution (9 :1) Cytolyte® (Cytic corporation)/ acide acétique glacial et l'autre non traitée. La concordance en termes de détection d'HPV entre les échantillons traités et non traités était de 97,5 % (117/120 soit 56 positifs pour les 2 aliquots et 61 négatifs). Après cette première étude de validation interne, la comparaison a été réalisée sur deux groupes de prélèvement AS-CUS : un groupe (A) de 98 échantillons prétraités à l'acide acétique et un groupe (B) de 1676 échantillons non traités. Pour ces deux groupes, la moyenne d'âge des femmes est comparable à 30 ans [14-60] pour le groupe A vs 32 ans [13-89] pour le groupe B.

La détection d'HPV à partir de prélèvements ASCUS traités était de 43,9 % (43/98) et de 50,4 % (845/1676) à partir des prélèvements ASCUS non traités. La fréquence de détection est donc comparable dans les 2 groupes ($p=0,214$). Les auteurs ont conclu que le prétraitement par l'acide acétique des échantillons contenant du sang n'affectait pas la détection de l'HPV par le test HC2 (46).

L'étude de Munson (47) a comparé 465 échantillons (sans précision du diagnostic cytologique) recueillis dans du milieu ThinPrep® et jugés insatisfaisants pour la cytologie (selon les critères de Bethesda). Ces échantillons avaient été traités dans 2 structures d'ACP différentes (A et B) par deux concentrations différentes d'acide acétique. La structure A a traité les échantillons par 30 mL d'une solution (9 :1) Cytolyte® / acide acétique glacial suivi d'une centrifugation. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 20 mL de solution Cytolyte®. La structure B a utilisé un protocole dans lequel 3 mL d'acide acétique glacial ont été ajoutés aux échantillons pendant 2 min suivi d'un ajustement avec 50 mL d'une solution Cytolyte® avant la centrifugation. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 5 mL de solution Cytolyte®.

La détection des HPV a été réalisée par hybridation avec le test Cervista® HPV HR.

Une diminution du signal de fluorescence a été observée après traitement par l'acide acétique glacial ($p<0,001$) avec un effet plus prononcé dans le laboratoire A (réduction du signal de 53 % versus 31,9 % pour le laboratoire B). Parmi les 79 échantillons HPV positifs avant traitement par acide acétique, 3 (3,8 %) étaient indéterminés après le traitement par acide acétique et 23 (29 %) négatifs. Parmi les 26 échantillons retrouvés HPV positifs après acide acétique, le signal de fluorescence pour le DNA et pour HPV était diminué de 53,6 % et 56,4 % (47).

³⁶ L'ADN des HPV est majoritairement sous forme d'épisome dans les lésions bénignes. L'ADN des HPV (oncogènes ou à haut risque) est le plus souvent intégré dans les cellules cancéreuses

Les auteurs ont conclu que, dans le contexte particulier du test d'Hybridation Cervista® HPV HR, le traitement par acétique d'acide des frottis prélevés dans du milieu ThinPrep® peut modifier de manière significative le signal de fluorescence de l'ADN et engendrer des faux négatifs. Ils recommandent à cet égard que les échantillons initialement peu satisfaisants pour l'analyse cytologique soient aliquotés avant traitement par acide acétique en prévision d'une détection potentielle d'HPV en cas de frottis ASCUS.

Ces deux études arrivent à des conclusions différentes quant à l'impact d'un pré-lavage des frottis par l'acide acétique glacial sur la détection d'HPV. Il est difficile d'en tirer une conclusion générale dès lors que les contextes sont différents en termes de population et de tests de détection d'HPV.

6.5 Impact de la durée de conservation sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV

Quatre études se sont intéressées à l'impact de la durée de conservation des échantillons sur la détection d'HPV.

Dans l'étude de Hardie *et al.* (48), deux structures de cytologie (A et R) ont envoyé 796 prélèvements à un laboratoire de virologie spécialisé dans l'analyse des HPV.

Pour le site A, la cohorte était composée de 399 patientes d'âge médian 40 ans [19-72], chez qui une colposcopie a été réalisée. Le transport et la conservation des échantillons ont été effectués dans du milieu BD SurePath® à température ambiante.

Pour le site R, la cohorte était composée de 397 patientes d'âge médian 35 ans [20-67] et les échantillons ont été prélevés aussi bien dans le cadre d'un dépistage régulier que chez des patientes ayant subi une colposcopie. Les prélèvements ont été transportés et conservés dans du milieu BD SurePath® à une température comprise entre 4 et 10 °C.

L'effet du temps et de la température sur la détection des HPV HR a été évalué par deux tests, respectivement HC2 et Roche-AMPLICOR® qui semble exiger des conditions de conservation plus strictes. Tous les échantillons discordants ont été analysés par le test de génotypage Linear Array® HPV Genotyping.

Les échantillons ont été testés par HC2 dans un délai médian de conservation de 14 jours au site R (de 8 à 27 jours) et de 16 jours (7–28 jours) au site A. Le nombre de jours a été calculé entre le moment du prélèvement et la dénaturation pour la technique HC2 et l'extraction des acides nucléiques pour le test AMPLICOR.

La concordance entre les 2 tests de détection a été réalisée à partir d'échantillons conservés de 0 à 14 jours, de 15 à 21 jours et 22 à 28 jours. Aucune différence en termes de concordance (82 %, 92 % et 85 % respectivement (IC 95 %)) n'a été retrouvée.

Quarante-neuf échantillons ont été trouvés discordants entre les 2 tests au site A et 43 au site R. Parmi les 43 échantillons HC2 positif/AMPLICOR® négatif, 9 contenaient des HPV bas risque et 24 des HPV possiblement oncogènes 53 (n = 15) et 66 (n = 9). Parmi les 49 échantillons HC2 négatif/AMPLICOR® positif, 7 contenaient des HPV bas risque et 22 des HPV HR dont HPV 16 (n = 8) et HPV 18 (n = 2). Bien que 3 échantillons aient été invalidés en raison de l'absence d'amplification du contrôle de la β -globine au site A par le test AMPLICOR® (2 HC2 négatifs et un HC2 positif) et aucun sur le site R, la différence n'est pas significative entre les 2 sites (48).

L'étude de Saillors *et al.* (49), a évalué l'impact d'une durée de conservation plus longue sur la capacité de détection du test HC2. La FDA a validé le test HC2 avec le milieu PreservCyt® pour une durée de conservation de 21 jours. Une solution de dénaturation doit être ajoutée à l'échantillon et la conservation doit être réalisée à -20°C. L'étude de Saillors *et al.* a été réalisée

chez 207 patientes sans critère préalable de sélection à partir du diagnostic cytologique. Les prélèvements collectés représentaient donc un large panel de résultats diagnostiques allant du négatif aux grades cytologiques les plus élevés. Les prélèvements ont été analysés par HC2 dans un délai maximum de 21 jours de conservation puis analysés à nouveau après une conservation de 2.5 à 13.5 mois (médiane 197 jours). Parmi les 134 patientes trouvées positives lors du premier test (<21 jours), 127 ont été trouvées positives en HPV HR lors du 2ème test (>21 jours) et 7 négatives. Parmi les 73 patientes trouvées négatives lors du premier test, 21 ont été retrouvées positives en HPV HR lors du 2ème test et 52 négatives. La concordance globale était de 86 % ($\kappa=0,69$). Il n'a pas été retrouvé de différence en fonction du temps de conservation, la concordance était de 87 % pour les 90 échantillons à 3 mois, 86 % pour les 22 échantillons à 5 mois, 90 % pour les 20 échantillons à 6 mois, 76 % pour les 25 échantillons à 9 mois, 88 % pour les 25 échantillons à 11 mois et 92 % pour les 25 échantillons à 13.5 mois. Les auteurs expliquent en partie les différences retrouvées au cours du temps par l'utilisation de 2 lots de réactifs différents. En excluant les échantillons traités avec deux réactifs différents le taux de faux positifs passe de 3 % à 2% et de faux négatifs de 12 % à 8 %

Les auteurs ont conclu qu'en raison du taux de concordance élevé, le test HC2 peut être utilisé pour la détection des HPV à partir d'échantillons prélevés dans du milieu PreserCyt® après plusieurs mois de conservation.

Dans l'étude de Castle et al. (50), 9205 femmes sexuellement actives ont eu un examen gynécologique avec prélèvement cervical et un suivi. La brosse cervicale a été étalée sur lame pour la réalisation d'un frottis conventionnel puis placée dans du milieu PreservCyt® (Thinprep) pour la réalisation d'un frottis en phase liquide. L'échantillon résiduel de milieu PreservCyt® (ThinPrep®) a été conservé à température ambiante depuis 1996 (10 –26.7 °C). Un échantillon cervical a été prélevé en parallèle à l'aide d'un écouvillon en Dacron, placé dans du milieu STM et conservé à -70 °C. La première étape a consisté à déterminer l'effet de la durée de conservation. Pour cela les auteurs ont sélectionné les frottis LSIL de 1993 à 2000 soit 210 échantillons et 30 récents (moins de 4 jours de conservation). La recherche d'ADN HPV a été réalisée à partir de 30 échantillons de 1993 (8 ans de conservation), 29 de 1996 (5 ans de conservation) et 30 échantillons de 2000 (1 an de conservation), par HC2. Quarante dix prélèvements cervicaux (1997 à 1999) ont également été testés pour le gène de la β -globine (3 fragments amplifiés) et 29 échantillons remontant au plus à 1995 ont été réévalués en microscopie.

Aucune différence en termes de sensibilité de détection d'ADN HPV ($p=0,6$) ni en terme de *Relative Light Unit* (médiane géométrique de 37 RLU/PC) n'a été retrouvée pour les échantillons ayant 8 ans, 5 ans (118 RLU/PC) ou 1an (45 RLU/PC) de conservation. Les auteurs notent cependant une valeur en RLU plus faible pour les échantillons les plus anciens. Il est important de rappeler par ailleurs que le test HC2 n'est pas validé pour un suivi quantitatif compte tenu de la variabilité cellulaire des prélèvements et de l'absence de quantification de la cellularité des échantillons.

Une relative stabilité du gène de la β -globine a été retrouvée au cours du temps avec 3% d'échantillons non détectés à 1 an de conservation, 14% d'échantillons non détectés à 5 ans de conservation, 10% d'échantillons non détectés à 8 ans de conservation. Globalement, 15% des échantillons ne sont pas amplifiés pour le gène de la β -globine après 5 ans de conservation.

Parallèlement, la stabilité des frottis diminue au cours du temps de conservation : aucun échantillon non satisfaisant à 1 an de conservation, 14 % à 5 ans de conservation et 41 % à 8 ans de conservation ($P=0.0001$). Il existe une différence de stabilité importante entre 5 et 8 ans de conservation. Il existe une dégradation des anomalies nucléaires visibles sur les frottis au cours du temps qui n'est associée ni à l'âge de la femme ni aux réactions inflammatoires cervicales mais plutôt à la stabilité de l'ADN qui a été mesurée par l'amplification du gène de la β -globine ($P 0.07$, Pearson chi-square test) (50).

L'étude de Powell et al. (51) a évalué *in vitro* l'impact de la durée de conservation à partir de suspensions de cellules CaSki (contenant de l'HPV16 intégré dans le génome) préparées dans

deux milieux de conservation différents. Une quantité définie de cellules infectées a été remise en suspension dans 4 mL de milieu SurePath® ou ThinPrep® et conservée à température ambiante pendant 0, 0.1, 24, 48, 72, 144, 168 et 504 heures.

Les suspensions cellulaires ont ensuite été centrifugées, les culots cellulaires remis en suspension dans 4 mL de PBS et sédimentées par centrifugation avant extraction. L'extraction d'ADN et d'ARN a été réalisée par lyse en Trizol puis à l'aide de colonnes RNeasy® Mini spin. Une PCR quantitative a été réalisée pour détecter l'HPV 16 E7 (ARN et ADN). Il a été observé au cours du temps une stabilité de la quantité d'ADN et d'ARN dans le milieu PreservCyt alors qu'une diminution nette est enregistrée pour l'ADN et l'ARN avec le milieu SurePath®. Cette réduction a été plus marquée dans la tranche horaire de 0-150 h (soit jusqu'à environ 6 jours). Après 168 h dans le milieu SurePath®, la quantité d'ADN est réduite d'environ 103 fois et celle d'ARN de 104 à 105 fois. Le cDNA E7 n'est plus détecté à 504h dans le milieu SurePath®.

Les auteurs expliquent cette différence par la composition des milieux. SurePath® contient moins de 24 % d'éthanol alors que le milieu PreservCyt® contient 30-60 % de méthanol. Les auteurs suggèrent que la concentration d'éthanol dans le milieu SurePath® est insuffisante pour empêcher la dégradation progressive de l'ARN.

Concernant l'évaluation de l'impact de la durée de conservation des échantillons sur la détection de l'ADN d'HPV,

- L'étude de Hardie *et al.* (48) ne retrouve aucune différence en termes de concordance entre les tests HC2 et AMPLICOR pour les périodes allant de 0 à 14 jours, de 15 à 21 jours et de 22 à 28 jours (48).
- L'étude de Sailors *et al.* (49) ne retrouve aucune différence en fonction du temps de conservation avec le test de détection HC2. La concordance avec le résultat du premier test (< 21 jours) est de 87 % à 3 mois et de 92 % à 13,5 mois.
- L'étude de Castle *et al.* (50) ne retrouve aucune différence en termes de sensibilité de détection d'ADN HPV avec le test HC2 sur une durée de conservation de 8 ans ($p=0,6$). En revanche, il existe une dégradation de l'ADN (15 % des échantillons non amplifiés pour le gène de la β -globine après 5 ans de conservation) et des anomalies nucléaires au cours du temps (stabilité de l'ADN de la bêta-globine ($p=0.0001$) et préservation nucléaire ($p=0.0001$)).
- Dans l'étude de Powell *et al.* (51) la durée de conservation n'impacte pas la quantité d'HPV 16 E7 présente dans une lignée cellulaire infectée (ARN et ADN) sur une période de conservation de 168 h à température ambiante dans du milieu PreservCyt®. Par contre une diminution d'environ 103 fois pour l'ADN est observée lorsque les cellules infectées sont conservées dans du milieu SurePath®. Les auteurs expliquent cette différence par la composition des milieux en éthanol et méthanol.

Au regard des contextes propres à chacune des quatre études présentées ci-dessus, qui utilisent pour trois d'entre elles le test HC2 (une sur les 3 études utilise le test HC2 et le test Amplicor®) et la quatrième une PCR quantitative de l'HPV 16, la durée de conservation semble peu impacter la qualité des résultats de détection de l'ADN des HPV.

6.6 Impact de la température de conservation et de transport sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV

L'étude de Hardie *et al.* (48) décrite plus haut, a montré que la concordance entre les 2 tests HPV pour les échantillons normaux (204/233 échantillons) dans le laboratoire ayant conservé et transporté les échantillons à température ambiante était de 87,6 % alors qu'elle était de 93,9 % dans le laboratoire ayant conservé et transporté les échantillons réfrigérés. Le taux de concordance est plus élevé pour les échantillons réfrigérés [différence de 6,3 % (95 % CI, 0,6, 12,1) ; $P = 0.031$]. Pour les échantillons présentant des anomalies de haut grade la différence en fonction des conditions de conservation est plus minime (95 % versus 98 % de positifs par HC2 et 100 % versus 98 % par AMPLICOR, respectivement (48)).

L'étude de Castle *et al.* (50), a comparé des brosses cervicales placées dans du milieu PreservCyt® (Thinprep) et conservées à température ambiante depuis 1996 (10-26.7°C) avec des échantillons cervicaux prélevés en parallèle à l'aide d'un écouvillon en Dacron (Digene), placés dans du milieu STM et conservés à -70°C. La détection d'HPV par HC2 réalisée sur 12 échantillons prélevés en 1993 (8 ans de conservation) a montré une concordance de 11/12 ((2 négatifs et 9 positifs) et 1 seul échantillon était discordant (PreservCyt® +/STM-). (Concordance 91,9 % et $\kappa = 0,75$ (95 % CI 0.47–1.0)).

Concernant l'impact de la température de conservation sur la qualité des résultats des tests de détection, les études analysées montrent des résultats variables.

Dans l'étude de Hardie *et al.* (48) le taux de concordance des résultats de détection obtenus, sur des prélèvements recueillis dans du milieu SurePath®, avec les tests HPV HC2 et le test Roche AMPLICOR-HPV est plus élevé pour les échantillons réfrigérés (93,9 %) que pour les échantillons conservés à température ambiante (87,6 %)

Dans l'étude de Castle *et al.* (50), aucune différence de détection d'HPV par le test HC2 n'est observée entre 12 prélèvements cervicaux recueillis dans du milieu Thinprep® et conservés à température ambiante depuis 8 ans et les échantillons recueillis dans du milieu STM et conservés à -70 °C

6.7 Libération des acides nucléiques pour le test d'hybridation Hybride Capture II

6.7.1 Technique recommandée par le fabricant

Selon les recommandations du fabricant, après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est lavé avec 1 mL de PBS, vortexé puis centrifugé à 2 000 t/min pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est séché. L'échantillon est remis en suspension avec 100 µL du milieu de transport Cervical Sampler™ pour test HPV. La technique HC2 utilise une lyse comprenant l'utilisation d'un réactif dénaturant pendant 45 min à 65°C suivie d'une hybridation ADN/ARN puis d'une capture et d'une détection des hybrides. La lecture s'effectue au luminomètre avec amplification du signal en chemiluminescence. Le résultat est rendu en RLU (unité relative de lumière) par rapport au contrôle témoin positif. Les échantillons sont considérés comme positifs si le rapport est supérieur à 1, c'est-à-dire à la moyenne des rapports des témoins positifs.

6.7.2 Modifications du protocole recommandé par le fabricant

Dans les 3 études qui sont décrites ci-dessous, l'objectif était de valider un milieu de conservation autre que ceux recommandés par le fabricant (Qiagen) pour le test HC2. La validation de ces milieux a nécessité un protocole adaptatif pour la libération des acides nucléiques.

L'étude de Leduc *et al.* (43), décrite en 3.1.2, avait pour but de valider le milieu liquide de conservation cellulaire Easyfix® pour la détection d'ADN de papillomavirus humain (HPV) oncogène par la méthode Hybrid Capture II®. Les prélèvements recueillis dans le milieu de conservation cellulaire Easyfix® ont été comparés aux prélèvements traités au moyen du kit Cervical Sampler™ fourni par la société Digene. Les prélèvements en milieu Cervical Sampler™ ont été traités selon les recommandations de la société Digene (voir ci-dessus). Pour les échantillons prélevés en milieu Easyfix®, le protocole a été réadapté. Dans un premier temps la concentration cellulaire a été évaluée et le volume d'échantillon utilisé adapté (10 mL pour les concentrations faibles, 5 mL pour les autres). Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec 1 mL de PBS, puis séché. L'échantillon est remis en suspension avec 100 µL du milieu de transport Cervical Sampler™ pour le test HPV. La détection HPV est ensuite réalisée selon le protocole Digene avec cependant une modification de la phase de dénaturation (90 min avec 100 µL de NaOH).

La comparaison des résultats du test HPV sur les deux milieux montre une concordance pour 215 cas ($\kappa=0,74$) (43).

Etude de Pretet *et al.* (42) multicentrique et portant sur 134 patientes, a comparé le milieu Novaprep® avec le milieu STM® considéré comme milieu de référence (Qiagen) pour la détection HPV HR par le test HC2 et le génotypage Inno-Lipa®. L'utilisation du milieu Novaprep® nécessite une adaptation pour le test HC2. Les échantillons sont centrifugés 5 min à 1000 g à température ambiante et les surnageants sont ensuite éliminés. Pour éliminer le reste de fixateur, les culots cellulaires sont lavés dans 1 mL de PBS avec passage au vortex. Après centrifugation (5 min à 2000g), les cellules sont remises en suspension dans 200 µL de milieu STM et 100 µL de tampon de dénaturation. Les échantillons sont dénaturés à 65°C pendant 90mn. Un aliquot de 75 µL d'échantillon dénaturé est ensuite hybridé selon les recommandations du fabricant en vue de la détection par le test HC2. Un total de 131 comparaisons ont pu être réalisées.

Le taux de détection HPV HR était de 72 % avec Novaprep® vs 82 % pour STM® soit une concordance de 87 % ($\kappa = 0,63$). Globalement, en considérant les échantillons détectés positifs par HC2 et avec le test de génotypage Inno-Lipa® la concordance entre les deux milieux est de 99 % ($\kappa=0,97$).

L'étude de Hammou *et al.* (52) a comparé le milieu CMDH® avec le milieu STM® considéré comme milieu de référence (Qiagen) pour la détection HPV HR par le test HC2 à partir

d'échantillons de 108 patientes avec des anomalies cytologiques. Deux laboratoires A et B ont réalisé la recherche d'HPV par HC2 à partir de 50 brosses cervicales prélevées en parallèle dans les 2 milieux.

Les échantillons ont été centrifugés 10 min à 2500 rpm à température ambiante et les surnageants ont été éliminés. Pour éliminer le reste d'alcool, les culots cellulaires ont été vortexés et lavés dans 1 mL de PBS. Après centrifugation (10 min à 2500 rpm), les cellules ont été remises en suspension dans 150 µL d'un mélange STM et tampon de dénaturation volume à volume. Les échantillons ont ensuite été traités par le protocole recommandé par le fabricant Digène. Le nombre de cellules retrouvées avec la brosse prélevée en milieu CMDH est de 40 à 60 % plus élevé qu'avec le kit cytobrosse Digene. Les auteurs confirment ces résultats par la dilution d'un plasmide HPV16 dans les 2 milieux et mesure de la chemiluminescence. Pour 15 échantillons ils ont modifié la durée de dénaturation (de 45 minutes pour le protocole Digene à 90 mn) et montrent des variations importantes de RLU avec le milieu CMDH lorsque les échantillons sont dénaturés entre 45 et 80 minutes avec plus de faux positifs ou faux négatifs avec le milieu CMDH. Ils valident une durée de dénaturation de 90 minutes avec le milieu CMDH au lieu de 45 minutes (protocole Digene).

La comparaison des 2 laboratoires est excellente avec des différences inférieures à 2 % en RLU. Les auteurs concluent à l'importance de l'élimination de l'alcool du milieu de transport pour l'utilisation du test HC2 et de l'adaptation de la durée de dénaturation (52)

Les 3 études présentées ci-dessus sont des études de validation de nouveaux milieux de conservation pour le test HC2. Elles montrent que moyennant quelques adaptations au niveau du protocole d'extraction recommandé par le fabricant, il est possible d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec la technique recommandée par le fabricant (Qiagen).

6.7.3 Extraction à partir d'échantillons dénaturés par le réactif HC2 pour une détection par PCR

Dans l'étude de SH Rabelo-Santos *et al.* (53), l'objectif était d'évaluer la qualité de l'ADN HPV pour une détection par PCR à partir d'échantillons recueillis initialement pour le test HC2, testés et congelés à -20°C dans du milieu STM® en présence d'un agent dénaturant. Quatre vingt douze frottis anormaux (9 cervicites, 63 LSIL, 17 HSIL et 3 ASC-US) ont été recueillis. Sur les 92 échantillons testés par HC2, 84 étaient positifs et 8 négatifs.

Une nouvelle technique d'extraction de l'ADN à partir des échantillons congelés depuis 18 mois et contenant le réactif dénaturant HC2 a été mise au point dans cette étude : 450 µL d'échantillons dénaturés ont été précipités avec du NaAc 3 M à pH 5,2, 200 µg de glycogène et 100 µL d'éthanol absolu, congelés à -70 ° C puis centrifugés à 12.000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot est rincé dans 400 µL d'éthanol à 70 %, centrifugé à 3000 g pendant 5 min puis solubilisé dans 100 à 200 µL de solution de TE (Tris 1 mM EDTA 100 uM, pH 8,2). L'extraction a été automatisée sur l'automate Magna Pure LC, Roche et le kit d'extraction d'ADN Magna Pure LC isolement.

L'amplification du contrôle positif avec la β-globine (amorces G73 et G74) a démontré qu'avec cette méthode, l'ADN était extrait en moyenne dans 90 % des échantillons. Sur les 84 échantillons initialement positifs au test HC2, seuls 56 sont détectés par PCR (réalisée à l'aide des amorces PGMY09 et PGMY11), soit 67 % des échantillons qui avaient été congelés à -20°C pendant 18 mois (53).

Selon les auteurs, il est difficile de tirer une conclusion immédiate des résultats de cette étude. Avec cette nouvelle technique d'extraction de l'ADN, le rendement avoisine les 90 %, mais pour autant la concordance entre le test HC2 et la PCR sur les échantillons positifs reste faible. Une des raisons qui pourrait expliquer cette faible concordance serait la différence de détection entre les

deux techniques, le test HC2 étant décrit dans la littérature comme détectant plus d'HPV positifs que la PCR. Mais avant de conclure, il est nécessaire de valider cette technique sur de plus grandes séries de prélèvements.

6.8 Libération des acides nucléiques en vue d'une détection par PCR

Déjà dans l'étude de Peevor *et al.* (54), l'objectif était de comparer l'efficacité de la méthode d'extraction QIAamp commercialisée par Qiagen à une extraction par digestion à la Protéinase K sur des échantillons recueillis dans des milieux ThinPrep® ou SurePath®. L'ADN HPV HR a été détecté par 2 tests moléculaires, une PCR ELISA (PCR-EIA) utilisant des amorces GP5/6+ et réalisée avec des modifications mineures et le test PapilloCheck®. Cette étude a décrit par ailleurs des méthodes permettant de pallier les défaillances d'extraction d'ADN sur les échantillons jugés invalides (β -globine PCR négatif).

Au total, 883 échantillons ont été prélevés chez des femmes âgées de 25 à 60 ans avec un statut histologique de bas grade. Les échantillons ont été centrifugés à 3354g pendant 10 min, le surnageant décanté et le culot cellulaire repris dans 2 mL de tampon 10mMTris (pH 7.4). Le culot a été divisé en 2 fractions : une congelée à -80°C et l'autre reprise dans 500 μL de tampon 10mM Tris (pH 7.4). Cette deuxième fraction a été séparée en 2 aliquots de 100 μL dont l'un a été utilisé pour l'extraction et l'autre congelé à -80°C .

Extraction à la protéinase K : 10 μL de protéinase K sont ajoutés aux 100 μL du culot cellulaire, le tout est incubé à 56°C pendant 2 h, puis à 80°C pendant 10 min, puis à 4°C pendant 10 min et enfin centrifugé à 11,337g à 4°C pendant 10 min.

Extraction QIAampMinElute kit (Qiagen, Hilden, Germany) : l'ADN est extrait à partir de 100 μL de contrôle ou de l'échantillon clinique selon les instructions du fabricant. L'ADN est élué dans un volume final de 100 μL .

Tous les extraits d'ADN ont été contrôlés par la β -globine. Les échantillons contrôles ont été préparés à partir de dilutions de β -globine de 5 à 5000 cellules/mL. Une efficacité d'extraction identique a été obtenue entre le kit QIAamp et la technique à la Protéinase K pour les échantillons de bas grade histologique avec les deux milieux de conservation en phase liquide. Pour les deux méthodes, 93,3 % des échantillons étaient positifs pour la β -globine, un échantillon était négatif en β -globine et pour 6,7 % des échantillons les résultats de β -globine étaient inconstants.

La prévalence d'échantillons invalides (β -globine négative) a été ultérieurement évaluée sur une cohorte de 10.000 patientes suivies dans le cadre du dépistage de routine. Les échantillons cliniques ont été prélevés en milieu SurePath®, l'extraction réalisée par protéinase K avec analyse concomitante par PCR de la β -globine. Sept pourcent (676/10.000) des échantillons étaient négatifs. Un échantillon représentatif constitué de 379 échantillons sur les 676 négatifs, a été traité comme suit pour déterminer la cause de la négativité du test :

- un nouveau test à partir de l'extrait d'origine a permis de valider le test dans 21,6 % des cas ;
- une réextraction à partir de matériel stocké a permis la validation de 56,2 % des échantillons. ;
- une dilution (1/10) a permis de valider 51,7 % des extraits d'origine et 28 % des nouveaux extraits.

Le protocole de ré-extraction et de dilution au 1/10 des échantillons non validés a permis la détection de 4,1 % d'échantillons HPV HR positifs (28 /676). Ce protocole permet de réduire le nombre de tests invalides de 7 % à un taux inférieur à 1 % (n=52)

Cette analyse ultérieure a permis de mettre en évidence l'importance des contrôles internes comme indicateurs d'efficacité de la PCR pour la prévention des échantillons invalides. Les résultats montrent que jusqu'à 86 % des échantillons initialement classés comme négatifs ont pu être validés pour la détection de l'HPV après une nouvelle extraction et une dilution au 1/10.

Les auteurs, dans cette étude, ont souligné les problèmes potentiels d'une extraction inefficace d'ADN. Ils considèrent que les échantillons réalisés en vue d'une analyse de cytologie en milieu liquide ne sont pas optimisés pour l'extraction de l'ADN. La majorité des protocoles d'extraction d'ADN recommandent un volume standard de matériel cellulaire. Or, cette approche ne tient pas compte de la variabilité cellulaire des prélèvements. Ainsi, ils recommandent une utilisation en temps réel d'un contrôle interne d'évaluation de la qualité de l'ADN combinée aux procédures automatisées d'extraction d'ADN ainsi que la réalisation d'un deuxième test (suivant les modalités décrites plus haut) pour tous les échantillons dont la quantité d'ADN s'est avérée insuffisante.

Dans l'étude de Roberts *et al.* (55), l'objectif était de comparer le test multiplex® PCR HPV au test de génotypage Linear Array®. Ces deux tests utilisant des volumes d'ADN différents (respectivement 4 µL et 50 µL pour la PCR multiplex® et pour le test Linear Array®) et des techniques d'extraction³⁷ d'ADN différentes, la comparaison directe n'était pas possible. Ainsi 4 protocoles de comparaison différents ont été réalisés pour évaluer, en termes de concordance entre les deux tests, à la fois l'influence du volume d'ADN utilisé et la technique d'extraction d'ADN.

L'ADN des échantillons a été extrait à la fois à l'aide du kit Qiagen blood Spin et du kit Qiagen MinElute. Les prélèvements ont été recueillis dans 1mL de milieu STM. Chaque échantillon a été divisé en trois aliquotes congelés. Le protocole du test de génotypage Roche Linear Array a été modifié avec une réduction de la quantité d'ADN utilisée de 50 µL à 4 µL (m-LA).

Les quatre comparaisons suivantes combinant techniques d'extraction et techniques de détection standard ou modifiées ont été réalisées :

- PCR multiplex HPV versus test LA modifié (m-LA) avec extraction Qiagen Spin blood à partir de 444 échantillons (4 µL d'ADN/PCR).
- Le contrôle interne β-globine était positif pour 440 échantillons avec la PCR multiplex et 406 avec le test LA modifié, 279 échantillons étaient positifs en HPV HR avec la PCR multiplex et 249 avec le test m-LA. Le taux global de concordance était de 0.881, variant de 0.90 pour les positifs à 0.83 pour les négatifs. Il varie selon le type d'HPV de 0.94 pour HPV31 à 0.998 pour HPV11.
- PCR Multiplex HPV versus test LA standard (s-LA) avec extraction Qiagen Spin blood comparées à partir de 432 échantillons
- Le contrôle interne β-globine a été trouvé positif avec la PCR multiplex pour 428 échantillons et 379 avec le test LA, 263 échantillons étaient positifs en HPV HR avec la PCR multiplex et 146 avec le test s-LA. 145 échantillons ont été considérés négatifs avec le test LA standard alors qu'ils avaient été détectés positifs par la PCR multiplex. Inversement, le test LA standard n'a identifié qu'un seul échantillon positif alors qu'il avait été classé négatif avec la PCR multiplex. Le taux de concordance était de 0.615 avec des proportions identiques pour les échantillons positifs et négatifs (0.618 à 0.612).
- Test LA standard comparé au test LA modifié avec extraction Qiagen Spin blood à partir de 432 échantillons (4 µL versus 50µL d'ADN par PCR).
- Le contrôle interne β-globine était positif avec le test LA standard pour 379 échantillons et 396 avec le test LA modifié, 159 échantillons étaient positifs en HPV HR avec le test s-LA et 265 avec le test m-LA. Le taux de concordance était de 0.719, allant de 0.750 pour les échantillons positifs à 0.679 pour les négatifs.
- PCR Multiplex HPV avec le test standard Linear Array avec extraction Qiagen MinElute media kit à partir de 168 échantillons.
- Le contrôle interne β-globine a été trouvé positif avec la PCR multiplex pour 167 échantillons et pour 168 avec le test s-LA, 127 échantillons étaient positifs en HPV HR avec la PCR multiplex et 157 avec le test s-LA (5 échantillons positifs par PCR multiplex alors que négatifs avec le test s-LA. De plus le test s-LA a identifié 35 échantillons positifs alors qu'ils étaient classés négatifs par la PCR multiplex. Le taux de concordance était de 0.760, allant de 0.859 pour les échantillons positifs à 0.200 pour les négatifs.

37 Le kit Qiagen sang Spin est généralement celui qui est utilisé pour le test multiplex HPV PCR, et le kit Qiagen MinElute est celui qui est recommandé pour la technique Linear Array.

Dans cette étude, il a été démontré que l'extraction de l'ADN avec le kit Qiagen Spin blood a permis, sur 377 échantillons (β -globine positive), la validation de la détection de 14 types d'HPV par les 3 techniques : PCR multiplex HPV, m-LA et s-LA.

La PCR multiplex a permis de détecter plus d'échantillons HPV positifs que les techniques s-LA et m-LA quand l'ADN était extrait avec le kit Qiagen Spin blood (51,3 % d'échantillons positifs avec la PCR multiplex, 46,2 % avec le test m-LA et 31,6 % avec le test s-LA). En revanche, le changement de méthode d'extraction (Qiagen MinElute media) impacte négativement la détection avec la PCR multiplex en particulier pour certains génotypes (HPV59, HPV35, HPV51).

L'étude de Dixon *et al.* (56) avait pour objectif de démontrer que des échantillons cervicaux prélevés en milieu SurePath® et stockés à température ambiante étaient compatibles avec le test Amplicor® HPV. Dans cette étude, des modifications du protocole d'extraction ont été testées en vue d'optimiser l'extraction à partir d'échantillons conservés à température ambiante moins de 21 jours en milieu Surepath®.

Le protocole modifié intègre, avant extraction par le kit AmpliLute®, une étape de prélavage du culot cellulaire par du PBS pour éliminer les traces résiduelles de milieu SurePath®. Après lavage du culot cellulaire avec du PBS (centrifugation à 14.100g 3 mn) il est remis en suspension dans 2 mL de PBS dont 250 μ L ont été utilisés pour l'extraction AmpliLute®. Ce protocole a été testé sur des prélèvements cervicaux (maintenus 21 jours à température ambiante (21 -42 jours) en milieu SurePath®) de 146 femmes (51 NILM, 39 ASCUS, 30 LSIL, 26 HSIL). L'extraction par le kit AmpliLute® a été suivie d'une détection par Amplicor®.

Le gène de la β -globine a été détecté dans 100 % des cas et l'HPV HR a été détecté dans 42 % (18/39) des échantillons ASCUS, 63 % (19/30) des échantillons avec anomalies cytologiques modérées et 92 % (24/26) des échantillons avec dysplasie sévère. Les auteurs concluent que l'ADN isolé des échantillons prélevés en milieu SurePath® et conservés moins de 21 jours à température ambiante est compatible avec le test Amplicor® moyennant des modifications minimales du protocole (56).

L'étude de Peevor (54), montre l'intérêt d'un contrôle interne pour évaluer la qualité de l'ADN. Ce contrôle, qui doit être combiné aux procédures automatisées d'extraction d'ADN, a permis de détecter les échantillons invalides (β -globine négative, 7 % d'échantillons sur une cohorte de 10000 patientes). Cette étude montre par ailleurs qu'une nouvelle extraction avec une dilution au 1/10 a permis de réduire le nombre de tests invalides de 7 % à un taux inférieur à 1 %.

L'étude de Roberts (55) montre que l'extraction de l'ADN à l'aide du kit Qiagen MinElute media (qui n'est pas la technique recommandée par le fabricant pour le test PCR multiplex) impacte négativement la détection HPV en particulier pour certains types viraux.

L'étude de Dixon (56) montre l'intérêt d'optimiser la détection de l'ADN des HPV en adaptant les protocoles d'extraction en fonction des milieux de conservation utilisés. L'intégration d'une étape supplémentaire de prélavage du culot cellulaire a permis de valider l'utilisation du milieu SurePath® avec le test de détection Amplicor®.

Au regard des conclusions apportées par ces 3 études, il ressort les éléments suivants :

- l'importance des contrôles internes comme indicateurs d'efficacité de la PCR ;
- qu'une méthode d'extraction non validée avec le test de détection de l'ADN d'HPV pour PCR pouvait impacter de façon très marquée la sensibilité de la détection ;
- la nécessité en cas d'utilisation de milieux autres que ceux recommandés par le fabricant du test de détection d'HPV, d'apporter des modifications au niveau des protocoles d'extraction afin d'optimiser la détection des HPV.

6.9 Impact des modifications de conditions PCR

Dans l'étude de Dixon *et al.* (56), 7 pools LSIL, 7 pools de cellules SiHa infectées par HPV16 ainsi que 146 échantillons recueillis sur milieu SurePath® ont été extraits à partir de 250 μ L d'échantillon par le kit AmpliLute avec les modifications minimales présentées dans le chapitre 3.1.8. La détection d'HPV a été ensuite réalisée par le test AMPLICOR HPV selon les recommandations du fabricant. Une augmentation de la température d'annealing de 54 à 58°C a été testée. L'augmentation de la température d'annealing permet d'augmenter la détection de la β -globine de 3/7 à 7/7 des pools LSIL. Par contre, elle n'impacte pas la détection des HPV (7/7 pour les 2 températures). La β -globine a été détectée dans les 146 échantillons testés par AMPLICOR HPV test (avec une température d'annealing de 58°C). Les HPV HR ont été détectés dans 46,2 % (18/39) des ASCUS, dans 63,3 % (19/30) des LSIL et 92,3 % (24/26) des HSI. La concordance des résultats par le test AMPLICOR HPV et Hybrid Capture II était de 83,9 % (56).

Dans l'étude de Roberts *et al.* (55), l'influence du volume d'ADN utilisé par PCR ainsi que la technique de PCR utilisée (PCR multiplex® spécifique et test de génotypage Roche Linear Array®) ont été évaluées. Si l'on ne s'intéresse qu'à 2 des 4 comparaisons présentées dans le chapitre 6.1.2 avec une extraction par Qiagen Spin blood® on constate que :

- l'utilisation de la même quantité d'ADN/PCR (4 μ L par PCR) mais testée avec 2 PCR différentes donne des résultats différents en terme de détection à la fois du contrôle interne β -globine (440 échantillons détectés avec la PCR multiplex et 406 avec le test LA) et en détection d' HPV HR (279 échantillons positifs avec la PCR multiplex et 249 avec le test LA).
- la modification de la quantité d'ADN utilisée pour la détection HPV à l'aide du même test Linear Array à partir de 432 échantillons (4 μ L versus 50 μ L d'ADN par PCR) entraîne des différences

de résultats en terme de détection à la fois du contrôle interne β -globine (positif avec le test LA standard pour 379 échantillons et 396 avec le test LA modifié) et en détection d'HPV HR.(159 échantillons positifs avec le test s-LA et 265 avec le test m-LA).

6.10 Conclusion de l'analyse des études

Très peu d'études concernant la phase pré-analytique de la recherche de l'HPV ont été identifiées. Pour une majorité d'entre elles, il s'agit d'études dont l'objectif était de valider une technique ou un site de prélèvement, un milieu de conservation autre que celui recommandé par le fabricant du test de détection d'HPV ou encore des conditions de conservation (durée et température). Certaines études qui validaient un milieu de conservation donné avec un test de détection donné, ont également décrit les protocoles de réadaptation avec les modifications intégrées soit au niveau de la phase d'extraction soit au niveau de la phase de détection des HPV.

La principale limite de toutes ces études est le faible nombre d'échantillons HPV HR positifs. De plus, chaque étude est très spécifique, elle évalue et compare les données dans un contexte particulier :

- ▶ patientes (âges, répartition des grades histologiques dans la population, etc.) ;
- ▶ milieu de conservation ;
- ▶ conditions de conservation ;
- ▶ protocole d'extraction des acides nucléiques ;
- ▶ test de détection.

Dans un tel contexte multifactoriel, il est difficile d'émettre des conclusions générales. En gardant en vue le contexte propre à chaque étude et à titre uniquement descriptif, les éléments suivants ont néanmoins pu être dégagés.

6.10.1 Concernant la technique de prélèvement,

Il ressort des trois études analysées, que la technique de prélèvement ainsi que le matériel utilisé (cytobrosse, brosses type Cervex Brush®, nombre de rotations, nature de l'écouvillon, nombre d'écouvillons utilisés par prélèvement...) pouvaient avoir un impact sur le nombre de cellules recueillies et donc sur la détection des HPV.

6.10.2 Concernant le site de prélèvement,

Quatre études ont évalué l'impact du site de prélèvement sur le taux de détection et sur les génotypes retrouvés. La comparaison du taux de détection d'HPV au niveau des différents sites de prélèvement (cervicaux, vaginaux, labial/vulvaire/périnée) ne retrouve pas de différence significative dans 3 études, une quatrième étude montre en revanche que dans les lésions CIN 3, la détection des HPV HR semble être plus importante dans les prélèvements cervicaux (87,5 % versus 75,0 %) comparés aux prélèvements vaginaux mais la différence n'est pas significative.

Des différences sont retrouvées dans deux études au niveau de la cartographie de certains génotypes, avec une plus grande prévalence du type 6 et 32 dans les prélèvements vaginaux (expliquée par les auteurs par la présence de verrues) et une plus grande prévalence des HPV 52 et 16 dans les échantillons cervicaux.

▶ Concernant le milieu de transport et de conservation

Le fabricant de chaque test de détection des HPV décrit dans sa notice d'utilisation le ou les milieux de transport cellulaire avec lesquels il est validé. Un milieu de transport peut également être « validé » pour une technique de détection à la suite d'expériences réalisées dans un laboratoire et publiées dans une revue scientifique.

Quatre études identifiées correspondent à des études de validation de milieux de conservation avec un test de détection et/ou génotypage donné.

Trois études sur 4 ont validé les milieux UCM®, Easyfix® et Novaprep® pour le HC2. Une de ces 3 études a validé également l'utilisation du milieu Novaprep® pour le test de génotypage Inno-Lipa®.

La quatrième étude a montré une bonne concordance de détection d'ADN HPV avec un liquide rince bouche (Scope®) et le milieu PreservCyt® pour les deux tests de détection Linear Array® HPV genotyping test et AMPLICOR® MWP.

Enfin, une cinquième étude a décrit l'impact négatif de l'utilisation du milieu PapSpin® sur la détection de l'ADN HPV par PCR utilisant les amorces consensus MY09/MY11. Une différence significative 6 fois supérieure de la concentration d'ADN est retrouvée entre les contrôles en PBS et les échantillons prélevés en milieu PapSpin® ($p < 0,0001$). La détection d'HPV est 8,9 fois plus fréquente à partir des contrôles en PBS ($p < 0,000001$).

Les cinq études identifiées avaient pour objectif la validation d'un milieu de conservation donné avec une technique de détection donnée et dans toutes ces études des discordances entre les positifs et/ou les négatifs ont été retrouvées pour les différents milieux comparés.

Il est difficile, compte tenu de la diversité des kits de détection disponibles et des milieux de conservation disponibles (cf. annexe 4), de l'absence dans la littérature de grandes études ayant pour objectif la comparaison des résultats de détection obtenus avec différents milieux de transport pour un test d'ADN donné, d'émettre une conclusion quant à l'impact sur la sensibilité de détection des tests HPV de l'utilisation d'un milieu de transport qui n'est pas celui recommandé par le fabricant.

► **Concernant les conditions de conservation des prélèvements : durée, température, avec ou sans milieu de transport**

Une seule étude a recherché l'impact du transport des prélèvements sur écouvillons à sec, en comparant les prélèvements cervicaux recueillis à température ambiante et conservés dans du milieu de transport (STM) à ceux recueillis sur écouvillons secs. Il est ressorti que le milieu de transport permettait de maintenir une meilleure intégrité de l'ADN cellulaire et en conséquence une meilleure sensibilité de détection des HPV.

Quatre études ont évalué l'impact de durées de conservation variables sur la sensibilité de détection de l'HPV, au regard des contextes propres à chacune des quatre études qui utilisent pour trois d'entre elles le test HC2, une sur les trois le test HC2 et le test Amplicor® et la quatrième une PCR quantitative de l'HPV 16, la durée de conservation semble peu impacter la qualité des résultats de détection de l'ADN des HPV.

Deux études montrent des résultats variables concernant l'impact de la température de conservation :

- la première étude montre un taux de concordance des résultats obtenus, sur des prélèvements recueillis dans du milieu SurePath®, avec les tests HPV HC2. Le taux de positivité pour le test Roche AMPLICOR-HPV est plus élevé pour les échantillons réfrigérés (93,9 %) que pour les échantillons à température ambiante (87,6 %). Mais au travers de ces résultats, il est difficile de déterminer quel test de détection est plus sensible à la variation de la température ;
- la deuxième étude ne retrouve aucune différence de détection d'HPV par le test HC2 sur 12 prélèvements cervicaux recueillis dans du milieu Thinprep®, conservées à température ambiante depuis 8 ans à des échantillons recueillis dans du milieu STM et conservé à -70 °C.

L'impact du prélavage par l'acide acétique glacial sur la sensibilité de détection de l'ADN des HPV a été évalué dans deux études qui arrivent à des conclusions différentes.

Dans la première, la comparaison a été réalisée sur 120 échantillons. Chaque échantillon a été divisé en 2 fractions dont l'une a été lavée par une solution (9 :1) (Cytolyte®/acide acétique glacial) et l'autre non traitée. La fréquence de détection observée avec le test HC2 était comparable dans les 2 groupes ($p=0,214$).

La deuxième étude a comparé 465 échantillons recueillis dans du milieu ThinPrep®, et traités dans 2 structures d'ACP différentes (A et B) par des solutions acide acétique glacial/Cytolyte® respectant respectivement les rapports 1/9 et 1/17. La détection des HPV a été réalisée par hybridation avec le test Cervista® HPV HR. Une diminution plus prononcée du signal de fluorescence de l'ADN a été observée ($p < 0.001$) avec un effet plus marqué dans le laboratoire A dont la solution utilisée est plus chargée en acide acétique glacial.

6.10.3 Concernant les techniques d'extraction de l'ADN pour les tests d'hybridations

Les études qui sont décrites dans ce travail avaient pour objectif premier de valider de nouveaux milieux de conservations pour le test HC2, elles ont montré qu'il était possible d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus avec la technique recommandée par le fabricant (Qiagen) mais que cela nécessitait des modifications du protocole d'extraction du fabricant et donc une validation par le laboratoire.

6.10.4 Concernant les techniques d'extraction de l'ADN des HPV pour la PCR

Des 3 études analysées, il est ressorti :

- qu'une méthode d'extraction non validée avec le test de détection par PCR de l'ADN d'HPV pouvait impacter de façon très marquée la sensibilité de la détection. En effet, une première étude a montré que l'extraction de l'ADN à l'aide du kit Qiagen MinElute media (qui n'est pas la technique recommandée par le fabricant pour le test PCR multiplex®) impactait négativement la détection en particulier pour certains types viraux ;
- la nécessité en cas d'utilisation de milieux autres que ceux recommandés par le fabricant du test de détection d'HPV, d'apporter des modifications au niveau des protocoles d'extraction afin d'optimiser la détection des HPV. Dans une deuxième étude, il a été montré qu'en intégrant une étape supplémentaire de prélavage du culot cellulaire, il a été possible de valider l'utilisation du milieu SurePath® avec le test de détection Amplicor® ;
- Enfin, l'importance des contrôles internes comme indicateurs d'efficacité a été soulignée en particulier par les auteurs d'une 3ème étude qui soulèvent le problème potentiel d'une extraction inefficace d'ADN. Ils expliquent en effet que compte tenu du fait que la majorité des protocoles d'extraction d'ADN recommandent un volume standard de l'échantillon de cytologie en milieu liquide, il n'est pas tenu compte dans cette approche de la variabilité cellulaire des échantillons. Ils recommandent pour cela l'utilisation d'un contrôle interne combiné en temps réel aux procédures d'extraction de l'ADN.

6.10.5 Concernant la modification des techniques de PCR

Deux études ont évalué l'impact de la modification de la technique de PCR sur la détection d'HPV :

La première a évalué l'impact d'une modification de la quantité d'ADN en utilisant un volume de 4 μL au lieu des 50 μL d'ADN préconisés pour le test Linear Array®. Elle a conclu que la modification de la quantité d'ADN utilisée entraînait des différences de détection à la fois pour le contrôle interne β -globine et pour l'HPV HR.

La deuxième a montré qu'une augmentation de la température d'annealing (ou hybridation) de 54 à 58°C permettait d'augmenter la détection de la β -globine et ne modifiait pas la détection des HPV par le test Amplicor®.

Au regard de ces 2 études il apparaît que toute modification des conditions de PCR impacte la détection du contrôle interne et/ou des HPV.

En conclusion, compte tenu de la multiplicité des milieux de transport, des techniques d'extraction, des techniques de détection et de la variabilité des populations dans les études, il apparaît difficile d'établir des conclusions générales à partir des quelques études identifiées portant sur des points partiels.

Il ressort néanmoins, au regard des éléments qui se dégagent des études en tenant compte de leurs contextes particuliers :

1- L'importance de suivre strictement les instructions des fabricants concernant :

- les techniques de prélèvement ;
- l'utilisation des milieux de transport ;
- les conditions de conservation (délai et température) ;
- les techniques d'extraction.

2- La nécessité d'évaluer l'impact potentiel sur la qualité de détection des tests HPV de toute modification apportée aux instructions des fabricants.

3- l'intérêt de valider des protocoles adaptés en cas de modification des paramètres préconisés par le fabricant.

7. Synthèse de l'avis des professionnels

Du 24 au 31 mai 2013, onze professionnels (cf. liste des participants à la fin du document), représentant les différentes spécialités concernées par le sujet (1 sage femme, 3 gynécologues, 3 anatomocytopathologistes, 3 biologistes, 1 infectiologue) ont été auditionnés individuellement sur la base d'un questionnaire préétabli (cf. annexe 7). Ce questionnaire concernait les différentes étapes de la phase pré-analytique du test de détection de l'ADN des HPV. Leurs propos ont fait l'objet de compte rendus écrits par la HAS et validés par chaque expert auditionné (cf. annexe 8 pour les CR *in extenso*).

L'ensemble des éléments recueillis auprès des experts a ensuite fait l'objet de la synthèse qui suit.

Tous les experts ont souligné l'importance de la phase pré-analytique, selon eux, de loin la plus cruciale car elle conditionne le résultat du test et en conséquence la décision médicale en aval. Ils ont par ailleurs confirmé le peu de travaux publiés sur la phase pré-analytique, qui malgré son importance ne suscite pas beaucoup d'engouement chez les professionnels plus enclins à publier sur l'efficacité des techniques. L'évaluation de la HAS leur a donc semblé tout à fait opportune.

Ils ont par ailleurs rappelé la spécificité du contexte organisationnel du test de détection des HPV, et souligné les éléments suivants :

- 3 intervenants différents : le clinicien qui réalise le FCU (gynécologue, médecin généraliste, sage-femme), l'ACP qui réalise la cytologie, le biologiste médical ou l'ACP qui réalise la détection du test HPV ;
- la complexité logistique pour l'ACP qui doit garder ce prélèvement un certain temps avant que le gynécologue ne décide de la conduite à tenir en cas d'ASC-US, (la recherche d'HPV étant l'une des 3 options possibles de conduite à tenir devant un frottis ASC-US qui ne représente qu'environ 3 % des cytologies) ;
- la position en fin de chaîne des biologistes et/ou des ACP, qui réalisent le test, à qui il est demandé une fiabilité des résultats sur un prélèvement dont ils n'ont pas géré toute la phase pré-analytique.

Dans un tel contexte, les experts ont insisté sur une bonne coordination des différents intervenants, prérequis à une réalisation optimale de la phase pré-analytique. Cette coordination passe par un accord *a priori* entre les anatomopathologistes et les professionnels qui réalisent la recherche de l'HPV (biologistes médicaux ou ACP) sur le choix du milieu dans lequel est déchargé le FCU. Ce milieu doit être compatible avec les techniques choisies d'une part pour la cytologie et d'autre part pour la recherche de l'HPV. Les informations échangées doivent aussi porter sur les conditions optimales de conservation (température et durée) et sur d'éventuels traitements des FCU. La coordination passe également par un recueil et une transmission des informations cliniques et techniques (via une fiche de transmission) d'une étape à l'autre de la phase pré-analytique.

- Les éléments qui ressortent de l'interrogation des experts sur la bonne réalisation de la phase pré-analytique du test de détection des HPV sont présentés ci-dessous. Ils s'inspirent par ailleurs, comme l'ont rappelé les experts, des règles présentes dans le GBEA et dans la norme NF EN ISO 15189.

7.1 Identification et traçabilité des prélèvements

- Identifier et étiqueter des prélèvements en respectant la concordance entre l'échantillon prélevé et l'identité de la patiente.
- Assurer la traçabilité des prélèvements via une fiche de transmission qui doit recueillir les informations suivantes :
 - ▶ Identification du prescripteur ;
 - ▶ Renseignements administratifs (nom et prénom de la patiente, adresse, N° de sécurité sociale) ;

- Renseignements cliniques : date des dernières règles, aménorrhée, grossesse, ... etc. ;
- Antécédents d'HPV ;
- Statut vaccinal anti HPV ;
- Date et heure du prélèvement ;
- Localisation du prélèvement : col, endomètre, autre... ;
- Conditions de conservation (délai et température) ;
- Traitements éventuels des FCU ;
- Cette fiche pourrait également permettre au clinicien d'indiquer s'il souhaite qu'une recherche d'HPV soit réalisée suite à une cytologie ASC-US.

7.2 Conditions optimales pour la réalisation d'un FCU en phase liquide

Dès lors que le prélèvement servira d'abord à l'examen cytologique, les experts considèrent que les règles préconisées pour un FCU optimal pour la cytologie en phase liquide doivent prévaloir pour le test HPV qui suivra éventuellement, avec en plus une grande vigilance vis-à-vis des inhibiteurs de la PCR. Les experts rappellent qu'il est indispensable d'éviter tout matériel de prélèvement dur qui peut provoquer le saignement (hémoglobine, inhibiteurs de PCR) et d'éviter la présence de produits chimiques locaux, médicaments, lubrifiants et gels également inhibiteurs de PCR.

Ainsi, les conditions optimales pour la réalisation et le transport d'un FCU en milieu liquide sont assez claires:

- le site de prélèvement privilégié se situe au niveau de la zone de jonction endocol/exocol ;
- le frottis, doit être réalisé sous contrôle visuel avec un spéculum adapté à l'âge et à la morphologie de la patiente ;
- éviter l'utilisation de lubrifiants avec le spéculum ;
- éviter le prélèvement pendant la période des règles ;
- éviter toute sollicitation physico-chimique (lubrifiant, savon, colposcopie...) en amont de la réalisation du frottis ;
- utiliser les œstrogènes (4 à 5 jours avant) chez les femmes ménopausées pour faciliter le prélèvement au niveau de l'endocol ;
- éviter un matériel de prélèvement dur (en bois ou en plastique rigide) pour ne pas faire saigner.
- éviter un matériel de prélèvement absorbant pour ne pas altérer la cellularité des prélèvements (porte-coton) ;
- privilégier un matériel en plastique souple ;
- éviter les spatules d'Ayre sauf pour les femmes ménopausées en raison de la sténose et de l'obstruction de l'orifice externe du col utérin ;
- broser la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol avec les cytobrosses ou les brosses types Cervex Brush ou autres brosses en opérant une rotation de 360 ° (2 ou 3 tours) ;
- décharger immédiatement le prélèvement dans le milieu de transport validé avec le test de détection d'HPV, conformément aux instructions du fabricant.

7.3 Importance de la cellularité des prélèvements

Les experts ont rappelé que le plus important au niveau de la réalisation du frottis en phase liquide était l'obtention d'un nombre suffisant de cellules à la fois de l'endocol et de l'exocol. Une faible cellularité des prélèvements peut avoir un impact négatif sur la sensibilité du test de détection d'HPV.

7.4 Transport et conservation des prélèvements pour les tests HPV

Les experts ont rappelé une particularité française, à savoir la disponibilité sur le marché de près de 17 milieux liquides différents pour la cytologie. Ces milieux, prévus à l'origine pour la cytologie,

ne sont pas tous validés pour la la recherche d'HPV, d'autant plus qu'il existe plusieurs techniques de recherche de l'HPV.

Ainsi, les experts recommandent pour le transport et la conservation des prélèvements destinés aux tests de détection d'HPV, de respecter les principes de bonne pratique de biologie moléculaire et les instructions des fabricants des tests de détection d'HPV en :

- évitant les composants utiles pour la cytologie mais délétères pour la détection HPV : les experts ont souligné que les problèmes engendrés par une utilisation de milieux non validés qui peuvent contenir des inhibiteurs de PCR ;
- utilisant strictement les milieux de transport validés par le fabricant du test de détection d'HPV ;
- respectant les préconisations du fabricant en matière de délai et de température de transport et de conservation ;
- évitant les cycles de congélation/ décongélation des acides nucléiques.

Pour l'emballage et le transport, les experts recommandent de :

- vérifier l'étanchéité des flacons avant envoi ;
- réaliser un emballage qui soit approprié à la nature et à la composition du milieu de transport et qui respecte l'intégrité du prélèvement et la sécurité des personnes.

7.5 Importance de l'assurance qualité

La notion de mise en place de procédures d'assurance qualité intra-laboratoire et inter-laboratoire pour l'examen de HPV a également été soulignée par certains experts.

Pour les ACP interrogés, les démarches de qualité et de bonnes pratiques sont actuellement volontaires dans le cadre par exemple de l'AFAQAP, il n'existe pas encore de cadre réglementaire défini, contrairement aux laboratoires de biologie médicale qui ont l'obligation de suivre actuellement le GBEA et une fois qu'ils seront accrédités la norme NF EN ISO 15189. La norme NF EN ISO 15189 ne peut être appliquée *in extenso* pour l'exercice de l'ACP. Néanmoins, ils ont à l'unanimité rappelé, conformément aux recommandations de l'AFAQAP, l'intérêt de respecter les bonnes pratiques édictées par le GBEA pour les actes de biologie moléculaire.

7.6 Autres aspects soulevés par les experts lors des auditions

Au décours de ces auditions qui concernaient les conditions pré-analytiques, des experts ont tenu à souligner divers aspects relevant de la phase analytique ou post-analytique ou encore des spécificités propres à certaines professions.

Les tests génotypage

Certains experts ont souligné la multiplicité des tests de détection de l'HPV utilisés en pratique en France avec des seuils différents de détection et des résultats de nature différente, spécificité a priori française, qui serait à l'origine de problème d'interprétation du résultat du test HPV.

Ils ont rappelé que les tests HPV « historiques » pour lesquels la performance clinique a été évaluée et sur lesquels reposent les recommandations actuelles ont des seuils compris entre 500 et 5000 copies/mL et sont des tests qualitatifs (présence ou absence d'HPV oncogènes).

Il existe des tests de génotypage plus récents, précisant le type d'HPV et pouvant détecter jusqu'à 20-30 copies/mL d'HPV. La pertinence clinique d'un si faible seuil n'a cependant pas été démontrée, leur utilisation pour le triage des ASC-US n'a pas été validée et aucune recommandation existante ne peut servir d'appui à l'interprétation de la présence de certains génotypes.

Pour illustrer ces propos, un des experts a rappelé que l'HPV « *n'est pas un marqueur tumoral* », et que la notion de charge virale dans ce contexte n'a pas de signification clinique. En effet, la présence d'HPV signe la présence d'une infection plus ou moins ancienne, mais qui est éliminée

dans 80 à 90 % des cas et seules les infections persistantes à HPV sont à risque de développement de lésions cervicales de haut grade.

Le rendu des résultats

Outre la spécification du test, de son seuil de détection, il a été souligné l'importance de spécifier également la structure qui a réalisé le test (dans le cas où l'ACP qui a réalisé la cytologie n'a pas réalisé la recherche de l'HPV et rend les deux résultats au clinicien).

La transmission des résultats du test HPV à la patiente

Plusieurs experts se sont interrogés sur la pertinence de la transmission du résultat du test HPV à la patiente, directement par courrier, en particulier quand ce résultat est positif³⁸. Les experts invoquent la complexité d'interprétation propre à l'infection HPV (voir ci-dessus), qui doit se faire à la lumière du contexte clinique et ACP.

Le résultat devrait donc selon eux être annoncé par le clinicien qui aura fait la synthèse de toutes les données (cliniques, cytologiques et virologiques) afin d'éviter à la patiente toute angoisse inutile.

Comme pour les conditions pré-analytiques, une concertation préalable entre les différents acteurs (cliniciens, anatomocytopathologistes, biologistes) quant à la manière dont doit être rendu le résultat de la recherche d'HPV, ainsi que celui de cytologie, doit être mise en place.

Pour le cas particulier des sage-femmes

Il a été souligné la nécessité de mettre en place des outils d'information, pour rappeler les mesures concernant le circuit de recueil et de transmission des informations en raison de :

- la spécificité du FCU, seul examen pour lequel la sage-femme est en lien direct avec la structure d'anatomocytopathologie ;
- la mise en place progressive de consultations préventives de gynécologie au sein de la profession ;
- l'importance d'un seuil d'activité suffisant qui permet d'une part d'avoir une maîtrise technique du geste et aussi une organisation fonctionnelle optimale.

Il a également été rappelé que le rôle de la sage-femme était de suivre les femmes dans un contexte non pathologique et qu'en cas de résultat cytologique anormal, la sage femme a l'obligation d'adresser la patiente au gynécologue.

Le non respect des instructions d'utilisation

³⁸ Pour la biologie médicale, le rendu du résultat au patient est encadré juridiquement. En effet, l'article L. 6211-2 du code de la santé publique précise que : « La phase post-analytique, qui comprend la validation, l'interprétation contextuelle du résultat ainsi que la communication appropriée du résultat au prescripteur et, dans les conditions fixées à l'article L. 1111-2, au patient, dans un délai compatible avec l'état de l'art ». Cet article prévoit donc que la communication du résultat au patient doit se faire de manière appropriée. Cette notion se retrouve aussi dans le sous-chapitre 5.1 du GBEA (arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale) : « Un résultat laissant présager un pronostic grave ou fatal ne doit être révélé qu'avec la plus grande circonspection. », « Tout résultat préoccupant que le biologiste est amené à remettre ne peut être communiqué au patient qu'en main propre et au cours d'un entretien particulier. ». Cette notion de communication appropriée apparaît opportune et adaptée au cas de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes.

Pour l'anatomie et la cytologie pathologiques, il n'existe aucun texte législatif et réglementaire spécifique encadrant le rendu du résultat au patient.

Par ailleurs, l'article L. 1111-7 du code de la santé publique prévoit que « Toute personne a accès à l'ensemble des informations concernant sa santé détenues, à quelque titre que ce soit, par des professionnels et établissements de santé, [...] ». Ainsi, lorsqu'une patiente demande son résultat d'examen, en l'espèce celui de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes, le professionnel de santé (biologiste médical ou anatomocytopathologiste) est dans l'obligation de le lui fournir.

Il a été souligné, lors des auditions, l'importance de suivre strictement les instructions du fabricant. Le non respect de ces dernières peut exonérer le fabricant de toute responsabilité et engager celle de l'effecteur³⁹.

³⁹ Conformément aux dispositions du code civil régissant la responsabilité du fait des produits défectueux, un producteur est responsable du dommage causé par son produit si ce dernier est défectueux (article 1386-1 du code civil) ; c'est-à-dire s'il n'offre pas la sécurité à laquelle on peut légitimement s'attendre (article 1386-4 du code civil). L'appréciation de la sécurité à laquelle on peut légitimement s'attendre prend notamment en compte l'usage qui peut être raisonnablement attendu du produit (article 1384-6 du code civil). Ainsi, les dommages causés par le non respect des instructions d'utilisation du fabricant et qui n'ont pas pour origine un défaut, n'engagent pas la responsabilité du fabricant sur le fondement de ces dispositions.

Dans l'hypothèse où les instructions du fabricant ne seraient pas suivies, c'est le principe général de la responsabilité prévu à l'article 1382 du code civil qui pourra s'appliquer lequel dispose « *Tout fait quelconque de l'homme, qui cause à autrui un dommage, oblige celui par la faute duquel il est arrivé à le réparer* », ce qui engage alors l'utilisateur du matériel.

En conclusion, les professionnels de santé interrogés ont préconisé de respecter, pour une phase pré-analytique optimale en général :

- les règles de bonnes pratiques concernant l'identification, la conservation, le transport des prélèvements et la mise en place des procédures de contrôle de qualité interne et externe. Ces règles rejoignent en général les préconisations du GBEA ;
- les principes de bonne pratique de biologie moléculaire (ex : en évitant les inhibiteurs de PCR (sang et produits chimiques), limitant les cycles de congélation-décongélation...).

Dans le contexte particulier du test HPV, les points à respecter sont selon les professionnels interrogés :

- une bonne coordination des différents intervenants de la chaîne (gynécologues, ACP et biologistes) ;
- respecter de préconisations relatives à la réalisation d'un FCU optimal ;
- la traçabilité du FCU avec la transmission d'une fiche avec identification du prescripteur et recueillant les renseignements administratifs, les renseignements cliniques, la date et l'heure du prélèvement, la localisation du prélèvement, les conditions de conservation (délai et température) et les informations sur les gestes techniques et les éventuels prétraitements réalisés sur les échantillons depuis le prélèvement jusqu'à l'arrivée au laboratoire qui réalise la détection de l'HPV ;
- s'assurer d'une bonne cellularité des prélèvements avec à la fois des cellules de l'endocol et de l'exocol ;
- utiliser un milieu de transport qui soit validé par les fabricants pour la cytologie, et la recherche d'HPV si le prélèvement est destiné aux deux analyses ;
- utiliser un milieu de transport qui soit validé par les fabricants pour la recherche d'HPV si le prélèvement n'est destiné qu'à cette analyse ;
- respecter des préconisations du fabricant du test HPV en matière de transport et de conservation (délai et température) ;
- utiliser un emballage approprié à la nature et à la composition du milieu de transport ;

8. Conclusion générale

Le présent travail avait pour objectif l'évaluation des conditions pré-analytiques de réalisation de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de frottis cervico-utérins (FCU). Il s'agissait :

- d'identifier les facteurs pré-analytiques susceptibles d'interférer avec les résultats de cette recherche ;
- d'établir les conditions de réalisation de la phase pré-analytique de cette recherche.

La phase pré-analytique de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes comprend la réalisation du FCU (*i.e.*, prélèvement des cellules du col), le recueil et la transmission de l'ensemble des éléments pertinents, le dépôt du FCU dans un milieu de conservation, son transport et sa conservation jusqu'à l'endroit et jusqu'au moment où la recherche d'HPV est effectuée. Il est à noter qu'une partie du FCU recueilli dans le milieu de conservation peut être utilisée pour réaliser la cytologie (lorsqu'elle est réalisée en phase liquide).

Ces conclusions s'appuient sur une analyse juridique des textes réglementaires identifiés, une analyse critique des recommandations professionnelles et des études identifiées de la littérature scientifique ainsi que sur le recueil de la position des professionnels dans le cadre d'auditions individuelles.

Concernant les facteurs pré-analytiques susceptibles d'interférer avec les résultats de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de frottis FCU

Peu d'études ont été identifiées. Elles portent sur des points partiels et ne permettent pas, compte tenu de la multiplicité des milieux de transport, des techniques d'extraction, des techniques de détection, de la variabilité des populations dans les études et de l'absence de données comparatives, de conclure - en particulier pour l'objet qui a motivé cette saisine - quant à l'impact que pourrait avoir l'utilisation d'un milieu de transport non validé par le fabricant sur la qualité de détection d'un test HPV donné. Cette conclusion prévaut pour tous les autres paramètres de la phase pré-analytique (prélèvement, transport et conservation, libération des acides nucléiques, etc...) susceptible d'impacter la sensibilité de détection des tests HPV.

Néanmoins, au regard des éléments qui se dégagent des études en tenant compte de leurs contextes particuliers, certains éléments peuvent être dégagés :

1- l'importance de suivre strictement les instructions des fabricants des différents matériels utilisés (matériel pour le prélèvement du FCU, liquide de conservation, réactifs et automates pour la cytologie et pour la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes) concernant :

- les techniques de prélèvement ;
- l'utilisation des milieux de transport ;
- les conditions de conservation (délai et température) ;
- les techniques d'extraction.

2- la nécessité d'évaluer l'impact potentiel sur la qualité de détection des tests HPV de toute modification apportée aux instructions des fabricants et l'intérêt de valider des protocoles adaptés en cas de modification des paramètres préconisés par les fabricants.

Concernant les conditions de réalisation de la phase pré-analytique de la recherche du génome (ADN) des HPV oncogènes à partir de FCU

Dans le contexte organisationnel particulier de cette recherche, la définition des bonnes pratiques de réalisation de la phase pré-analytique est d'autant plus importante qu'elle fait appel à plusieurs

intervenants, plusieurs milieux de transport, plusieurs trousse de détection et plusieurs circuits de transmission.

En effet, après prélèvement du FCU par un professionnel de santé (médecin, sage-femme), celui-ci est déchargé dans un flacon avec un milieu de transport. Plusieurs milieux de transport existent, ils peuvent être soit validés pour la cytologie, soit pour la recherche d'HPV soit pour les deux examens. Plusieurs tests HPV existent, et cette multiplicité fait que même si un milieu de transport est validé pour un test de détection donné, il ne l'est pas forcément pour tous les autres tests. A cette complexité se rajoute l'existence de deux types de cytologie : une cytologie conventionnelle (sur lame) et une cytologie en phase liquide qui seule permet la réalisation du test HPV sur le même prélèvement. Il faut noter également que la recherche d'HPV ne représente qu'une des trois options possibles préconisées par les recommandations en vigueur suite à une cytologie identifiant une ASC-US. L'ACP doit dans ce contexte conserver le prélèvement dans l'attente de la décision du clinicien.

Enfin, il convient également de rappeler que la détection d'HPV est un « acte frontière » qui peut être réalisé par :

- les biologistes médicaux soumis aux exigences législatives et réglementaires (GBEA actuellement et norme NF EN ISO 15189 dans le cadre de l'accréditation) ;
- les ACP à qui ces exigences ne s'appliquent pas mais pour lesquels existent des recommandations de bonnes pratiques établies par la profession qui préconisent de suivre les directives du GBEA pour les examens faisant appel aux techniques de biologie moléculaire (comme c'est le cas pour la recherche des HPV oncogènes).

Ainsi, selon que le frottis en phase liquide est réalisé en première intention pour la cytologie et/ou pour la détection d'HPV et selon que le test d'HPV est réalisé au laboratoire de biologie médicale ou dans la structure d'ACP, le frottis en phase liquide peut emprunter différents circuits :

- si le prélèvement destiné en première intention à la cytologie, le FCU est déchargé dans un milieu de transport qui doit convenir à la cytologie et à la recherche d'HPV, il est adressé par le clinicien à la structure d'ACP qui en cas de frottis ASC-US et après avis du clinicien :
 - l'adressera au laboratoire de biologie médicale ou à une autre structure ACP pour la réalisation du test HPV ;
 - ou réalisera le test HPV elle-même si elle dispose de la technique de détection *ad hoc*.
- si le FCU est destiné en première intention au test HPV (après diagnostic ASC-US sur frottis conventionnel), le frottis est déchargé dans un milieu conforme à la recherche d'HPV et ensuite adressé par le clinicien au laboratoire de biologie médicale ou à la structure d'ACP.

Dans un tel contexte, très multifactoriel, si toutes les étapes ne sont pas coordonnées et réalisées conformément aux bonnes pratiques et aux règles d'assurance qualité, les risques d'erreurs peuvent être multiples.

En conclusion, les principales préconisations qui ressortent de ce travail sont :

- La coordination et la transmission des informations relatives à toutes les étapes pré-analytiques entre l'ensemble des professionnels de santé intervenant dans ce contexte, quels que soient leurs lieux et leurs modes d'exercice.
- Le respect des règles de bonne pratique édictées par le GBEA (opposables pour les biologistes et recommandés par l'AFAQAP pour les ACP) en matière d'identification, de conservation et de transport des prélèvements, afin d'assurer à toutes les patientes, le même niveau d'exigence quant à la qualité de l'examen, et ce quel que soit le professionnel le réalisant.
- Le respect des procédures de réalisation d'un frottis cervico-vaginal optimal (conditions cliniques, matériel, technique et site de prélèvement).
- Le respect des principes de bonne pratique de biologie moléculaire :
 - éviter les inhibiteurs de PCR (sang et produits chimiques) ;
 - s'assurer d'une cellularité suffisante ;
 - limiter les cycles de congélation-décongélation.
- L'utilisation des milieux de transport conformément à la réglementation en vigueur c'est-à-dire :

Si le milieu de transport est marqué CE et que la trousse de détection est également marquée CE, respecter les préconisations de la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV) en utilisant une combinaison validée par les fabricants afin de ne pas porter atteinte aux performances prévues des dispositifs.

Dans les autres situations (cf. ci-dessous), les techniques devront être validées scientifiquement, s'appuyer sur des références bibliographiques et faire l'objet de procédures et de modes opératoires détaillés :

- combinaison d'un milieu de transport « maison » avec une trousse de détection marquée CE ;
- combinaison d'un milieu de transport marqué CE avec une trousse de détection « maison » ;
- combinaison d'un milieu de transport marqué CE mais non validé par le fabricant de la trousse de détection (marquée CE) utilisée.

En s'appuyant sur une analyse des préconisations générales du GBEA, des recommandations professionnelles de bonne pratique et des propos recueillis auprès des professionnels auditionnés, qui par ailleurs sont concordants, les éléments suivants ont pu être établis concernant :

- l'identification des prélèvements et la transmission des informations ;
- les modalités de réalisation du frottis cervico-vaginal en vue de la recherche du génome des HPV oncogènes ;
- le transport et la conservation des FCU en phase liquide ;
- les précautions à respecter à l'arrivée dans la structure qui réalise le test.

Identification des prélèvements et transmission des informations

1. La structure qui réalise le test HPV (structure d'ACP ou laboratoire de biologie médicale) fournit aux cliniciens réalisant le FCU (gynécologue, médecin généraliste, sage-femme, ...) et aux ACP toutes les précisions utiles aux conditions de mise en œuvre du test HPV.
2. Les échantillons sont associés à une « *fiche de suivi médical* », adressé au laboratoire ou au cabinet de cytologie, comportant tous les renseignements nécessaires à la bonne exécution des analyses et à l'interprétation des résultats et comportant les éléments suivants :
 - identification du prescripteur ;
 - le prénom et le nom de la patiente (nom de jeune fille) ;
 - la date du prélèvement ;
 - la date de naissance ;
 - la date des dernières règles ou indiquer si la femme est ménopausée ;
 - le motif de l'examen (dépistage, contrôle) ;
 - les éventuels antécédents gynécologiques et thérapeutiques (traitement du col, chimiothérapie, hormonothérapie, radiothérapie) ;
 - le type de contraception utilisée (contraception hormonale, dispositif intra-utérin),
 - la localisation du prélèvement ;
 - les conditions de conservation (délai et température) ;
 - toutes les informations sur les gestes techniques et les éventuels prétraitements réalisées depuis le prélèvement jusqu'à l'arrivée au laboratoire qui réalise la détection de l'HPV (ex. éventuels traitement par acide acétique, cas des frottis réalisés hors conditions optimales chez les femmes n'ayant pas de suivi gynécologique régulier⁴⁰)
3. Le récipient destiné à recevoir l'échantillon biologique est adapté à la nature de l'échantillon et à celle des analyses ;
4. L'étiquetage est conçu pour éviter toute erreur sur l'identité de la personne. Il mentionne, outre l'identité et la date de naissance, le nom de jeune fille, la nature de l'échantillon, le nom du préleveur et la date du prélèvement ;
5. Si la taille du tube ne permet pas l'apposition d'une étiquette comportant l'ensemble des renseignements précités, ce tube étiqueté est placé dans un récipient individuel où toutes les indications ci-dessus sont mentionnées de façon à éviter toute erreur.
6. Le biologiste ou l'ACP met en place une procédure permettant de lier l'échantillon biologique au patient, même si l'identité de celui-ci est incomplète ou approximative,
7. Si un étiquetage code-barres est utilisé, il ne doit pas masquer les renseignements énoncés en clair ;
8. Lors de la préparation de fractions aliquotes, l'étiquetage des tubes ou récipients secondaires se fait selon les procédures rigoureuses permettant l'identification sans ambiguïté de chaque échantillon.

⁴⁰ Lors de l'audition des professionnels, il a été souligné le cas particulier des femmes n'ayant pas de suivi gynécologique régulier et chez qui le médecin privilégiera avant tout la réalisation d'un FCU, « quelles que soient les conditions », plutôt que d'attendre que les conditions idéales soient réunies. Les professionnels ont néanmoins rappelé que ceci devait systématiquement signalé dans la fiche de suivi.

Modalités de réalisation du frottis cervico-vaginal en vue de la recherche du génome des HPV

1. Le prélèvement est effectué par un professionnel de santé (médecin, sage femme) ;
2. Les conditions optimales de réalisation d'un FCU, doivent autant que possible respecter les consignes suivantes :
 - Eviter le prélèvement pendant la période des règles.
 - Eviter les contextes d'inflammation ou d'infection vaginale.
 - Eviter les rapports sexuels dans les 24 heures.
 - Eviter la grossesse, le post-partum et l'allaitement.
 - Eviter toute sollicitation physico-chimique en amont de la réalisation du frottis : examen vaginal, crème ou liquide désinfectant, gel lubrifiant, médicaments vaginaux, douche vaginale ou gel spermicide (moins de 24 heures avant), coloscopie préalable avec l'acide acétique (moins de 24 heures avant), frottis (moins de 3 semaines avant), chirurgie cervicale (moins de 3 mois avant) ; radiothérapie.
 - Utiliser les œstrogènes (4 à 5 jours avant) chez les femmes ménopausées pour faciliter le prélèvement au niveau de l'endocol.
3. Le site de prélèvement privilégié se situe au niveau de la zone de jonction endocol/exocol.
4. Le frottis est réalisé sous contrôle visuel avec un spéculum adapté à l'âge et à la morphologie locale de la patiente.
5. Le prélèvement concerne la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol.
6. Eviter un matériel de prélèvement dur (qui provoque le saignement) ou un matériel absorbant (coton) et privilégier un matériel en plastique souple pour d'une part limiter les saignements (ce qui peut apporter des inhibiteurs de PCR) et d'autre part recueillir le maximum de cellules (le FCU peut aussi être utilisé pour réaliser une cytologie).
7. Eviter les spatules d'Ayre, sauf pour les femmes ménopausées en raison de la sténose et de l'obstruction de l'orifice externe du col utérin.
8. Brosser la totalité de l'orifice cervical externe et l'endocol avec le matériel recommandé par le fabricant du milieu de transport et en opérant autant de rotations que préconisé par le fabricant.
9. Décharger immédiatement le prélèvement dans un milieu de transport validé pour la technique qui sera ensuite utilisée pour rechercher le génome (ADN) des HPV oncogènes, conformément aux instructions des fabricants ou conformément aux procédures propres de la structure qui effectue la recherche le test de détection d'HPV.

Transport et conservation des FCU déchargés en phase liquide

1. Le transport des FCU respecte les règles qui assurent l'intégrité de l'échantillon et la sécurité des personnels.
2. Des procédures et des modes opératoires écrits par la structure qui effectue le test HPV fixent les conditions particulières de délai de transport, de température de conservation et d'intégrité de l'emballage des échantillons biologiques.
3. Le transport des FCU s'effectue le plus rapidement possible du cabinet à la structure qui réalise le test HPV en prenant toutes les précautions pour éviter les risques de contamination et de dégradation des constituants.
4. Le ou les récipients étanches contenant les prélèvements doivent être insérés dans une boîte étanche, tapissée par un matériau absorbant et l'ensemble placé dans un emballage extérieur résistant, portant les noms et adresses du laboratoire destinataire et de l'expéditeur.
5. L'étiquetage et la résistance des emballages doivent être conformes à la réglementation en vigueur.
6. La « fiche de suivi médical » (décrite plus haut) ou sa copie ou, à défaut, une fiche de renseignements établie par la structure qui réalise le test HPV, doit être associée au prélèvement.
7. Les dates et les heures de réception des prélèvements à la structure destinatrice doivent être enregistrées.
8. Les conditions de conservation doivent être conformes aux règles de sécurité et d'hygiène en vigueur pour éviter toute contamination du personnel ou toute pollution.
9. Les conditions d'identification, de fermeture des récipients et de température de conservation doivent être rigoureusement observées pour éviter tout risque d'erreur, de modification qualitative et/ou quantitative et de contamination.
10. Les conditions de conservation, température et durée, doivent être fixées par la structure qui réalise le test et inscrites sur ses procédures opératoires ; elles doivent être conformes aux instructions du fabricant du test HPV.
11. Si les tests de détection ne sont pas réalisés à la suite, les échantillons et leurs fractions aliquotes peuvent être soit congelés directement dans le milieu de transport et conservés à -70 °C soit préalablement centrifugés, dans ce dernier cas le traitement du culot d'ADN devra être réalisé selon les recommandations du fabricant du test.

A l'arrivée au niveau de la structure qui réalise le test HPV,

1. Le biologiste médical ou l'ACP vérifie la conformité des prélèvements acceptés dans sa structure en fonction des techniques et procédures qui y sont pratiquées.
2. Il s'assure de la cellularité suffisante des prélèvements et de l'absence d'inhibiteur de PCR (qui sont deux facteurs pouvant donner lieu à des résultats faussement négatif).
3. Il est en droit de refuser tout échantillon prélevé ou transmis dans des conditions non conformes aux procédures techniques et réglementaires.

Références

1. Haut conseil de la santé publique. Avis relatif à la révision de l'âge de vaccination contre les infections à papillomavirus humains des jeunes filles. Paris: HCSP; 2012.
http://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspa20120928_agevaccpapillieunesfilles.pdf
2. Haute Autorité de Santé. État des lieux et recommandations pour le dépistage du cancer du col de l'utérus en France. Synthèse et recommandations. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2010.
http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2010-11/synthese_recommandations_depistage_cancer_du_col_de_luterus.pdf
3. Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé. Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal. Actualisation. Recommandations. Saint-Denis La Plaine: ANAES; 2002.
http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/frottis_final_-_recommandations.pdf
4. Arrêté du 30 décembre 2003 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la nomenclature des actes de biologie médicale. Journal Officiel; 14 janvier 2004:1050.
5. Décision du 9 juillet 2009 de l'Union nationale des caisses d'Assurance Maladie relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'Assurance Maladie. Journal Officiel; 19 septembre 2009.
6. Heard I, Favre M, Fihman V. Enquête sur les pratiques de détection et de génotypage des papillomavirus humains dans les laboratoires de microbiologie en France en 2009. Ann Biol Clin 2011;69(3):303-9.
7. Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. Journal Officiel; 11 décembre 1999 (287):18441.
8. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology 2010;401(1):70-9.
9. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res 2004;64(11):3878-84.
10. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, *et al.* A review of human carcinogens. Part B: biological agents. Lancet Oncol 2009;10(4):321-2.
11. Behtash N, Mehrdad N. Cervical cancer: screening and prevention. Asian Pac J Cancer Prev 2006;7(4):683-6.
12. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, *et al.* Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. J Natl Cancer Inst 2008;100(7):513-7.
13. Elfgrén K, Jacobs M, Walboomers JM, Meijer CJ, Dillner J. Rate of human papillomavirus clearance after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. Obstet Gynecol 2002;100(5 Pt 1):965-71.
14. Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé. Évaluation de l'intérêt de la recherche des papillomavirus humains (HPV) dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Saint-Denis La Plaine: ANAES; 2004.
http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/HPV_%20rapport.pdf
15. Institut national de santé publique du Québec, Akom E, Venne S. L'infection au virus du papillome humain (VPH). Montréal: INSPQ; 2002.
http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/179_InfectionVPH.pdf
16. Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, *et al.* Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. Int J Cancer 2008;122(2):428-32.
17. Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B, *et al.* Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. Int J Cancer 2008;122(2):424-7.
18. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. Br J Cancer 2003;88(1):63-73.
19. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010;127(12):2893-917.
20. Institut de veille sanitaire, Duport N. Données épidémiologiques sur le cancer du col de l'utérus. État des connaissances. Actualisation 2008. Saint-Maurice: INVS; 2008.
http://www.invs.sante.fr/publications/2008/cancer_col_uterus_2008/cancer_col_uterus_2008.pdf
21. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. Am J Epidemiol 1995;141(7):680-9.
22. Décision du 18 janvier 2010 de l'Union nationale des caisses d'Assurance Maladie relative à la liste des actes et prestations pris en charge par l'Assurance Maladie. Journal Officiel; 25 avril 2010.
23. Institut de veille sanitaire, Duport N, Haguenoer K, Ancelle-Park R, Bloch J. Dépistage organisé du cancer du col de l'utérus. Évaluation épidémiologique des quatre départements "pilotes". Saint-Maurice: INVS; 2007.
http://www.invs.sante.fr/publications/2007/cancer_col_uterus%20evaluation/col_uterus.pdf
24. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. Journal Officiel; 4 mai 2002

(104):8375.

25. Centre national de référence des papillomavirus humain, Institut Pasteur, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, Heard I, Poisson F, Duran M, *et al.* Etude des conditions pré-analytiques de réalisation des tests de détection et génotypage des HPV par les laboratoires ayant participé au contrôle national de qualité externe AFSSAPS-CNR HPV en 2011. Paris: Institut Pasteur; 2012.

26. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Annales du contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale. Saint-Denis: ANSM; 2012.

<http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004j-01s/an11hvpv1-1-.pdf>

27. Inspection générale des affaires sociales, Lalande F, Yeni I, Laconde C. La biologie médicale libérale en France. Bilan et perspectives. Rapport n°2006 045. Paris: La Documentation Française; 2006.

<http://www.ladocumentationfrancaise.fr/var/storage/rapports-publics/064000445/0000.pdf>

28. Murat P. La phase pré-analytique des analyses de biologie médicale: rôle du PHISP: comment le biologiste assure la maîtrise de cette étape ? [Mémoire de l'Ecole nationale de santé publique]. Rennes: ENSP; 2003. <http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Ensp/Memoires/2003/phisp/murat.pdf>

29. Wiwanitkit V. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6 month monitoring. BMC Clin Pathol 2001;1(1):5.

30. Arbyn M, Herbert A, Schenck U, Nieminen P, Jordan J, McGoogan E, *et al.* European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for collecting samples for conventional and liquid-based cytology. Cytopathology 2007;18(3):133-9.

31. American Society of Cytopathology. Cervical cytology practice guideline. Wilmington: ASC; 2000. <http://www.cytopathology.org/website/download.asp?id=59>

32. Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques. Gestion d'une structure ACP recommandations et réglementations. Strasbourg: AFAQAP; 2008.

33. Association française d'assurance de qualité en anatomie et cytologie pathologiques. Recommandations de bonnes pratiques en anatomie et cytologie pathologiques V2. Strasbourg: AFAQAP; 2009. http://www.afaqap.org/IMG/pdf/RBPACP_v2_25012010-web.pdf

34. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, preparation, and storage of specimens for molecular methods. Approved guideline. Wayne: CLSI; 2005. <http://isoforlab.com/phocadownload/csli/MM13A.pdf>

35. Depuydt CE, Benoy IH, Bailleul EJ, Vandepitte J, Vereecken AJ, Bogers JJ. Improved endocervical sampling and HPV viral load detection by Cervex-Brush Combi. Cytopathology 2006;17(6):374-81.

36. Twu NF, Yen MS, Lau HY, Chen YJ, Yu BK, Lin CY. Type-specific human papillomavirus DNA testing with the genotyping array: a comparison of cervical and vaginal sampling. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011;156(1):96-100.

37. Krech T, Castriciano S, Jang D, Smieja M, Enders G, Chernesky M. Detection of high risk HPV and Chlamydia trachomatis in vaginal and cervical samples collected with flocked nylon and wrapped rayon dual swabs transported in dry tubes. J Virol Methods 2009;162(1-2):291-3.

38. Harper DM, Longacre MR, Noll WW, Belloni DR, Cole BF. Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. Ann Fam Med 2003;1(4):221-7.

39. Roberts CC, Liaw KL, Skjeldestad FE, Jansen KU, Bryan JT. Importance of specimen type in detecting human papillomavirus DNA from the female genital tract. J Med Virol 2009;81(9):1620-6.

40. Castle PE, Sadorra M, Garcia FA, Cullen AP, Lorincz AT, Mitchell AL, *et al.* Mouthwash as a low-cost and safe specimen transport medium for human papillomavirus DNA testing of cervicovaginal specimens. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16(4):840-3.

41. Taha NS, Focchi J, Ribalta JC, Castelo A, Lorincz A, Dôres GB. Universal Collection Medium (UCM) is as suitable as the Standard Transport Medium (STM) for Hybrid Capture II (HC-2) assay. J Clin Virol 2006;36(1):32-5.

42. Prêtet JL, Vidal C, Le Bail Carval K, Ramanah R, Carcopino X, Cartier I, *et al.* Novaprep® Vial Test is a suitable liquid-based cytology medium for high risk human papillomavirus testing by Hybrid Capture 2. J Clin Virol 2010;49(4):286-9.

43. Leduc F, Bonnière M, Farre I, Staelen P. Détection des HPV oncogènes par recueil sur milieu Easyfix. Ann Biol Clin 2004;62(6):687-90.

44. Gudlevieiene Z, Rimiene J, Krasauskaite I. Évaluation of new cytological fixative liquid medium suitability for HPV testing using PCR. Acta Med Lituan 2007;14(3):160-4.

45. Feng Q, Cherne S, Winer RL, Popov V, Zambrano H, Yerovi C, *et al.* Évaluation of transported dry and wet cervical exfoliated samples for detection of human papillomavirus infection. J Clin Microbiol 2010;48(9):3068-72.

46. Feng J, Husain M. Reflex high-risk human papillomavirus DNA testing (Hybrid Capture 2) of bloody ThinPrep specimens with atypical squamous cells of undetermined significance interpretation: does pretreatment with acetic acid affect test performance? Cancer 2005;105(6):452-6.

47. Munson E, Du Chateau BK, Nelson BE, Griep J, Czarnecka J, Amrhein RD, *et al.* Effect of glacial acetic acid treatment of liquid-based cytology collections on performance of Cervista HPV HR for detection of high-risk human papillomavirus. J Clin Microbiol 2012;50(6):2129-31.

48. Hardie A, Moore C, Patnick J, Cuschieri K, Graham C, Beadling C, *et al.* High-risk HPV detection in specimens collected in SurePath preservative fluid: comparison of

ambient and refrigerated storage. *Cytopathology* 2009;20(4):235-41.

49. Sailors J, Gander R, Saboorian MH, Berkley P, Foster B, Ashfaq R. Stability of PreservCyt® for Hybrid Capture® (HC II) HPV test. *Diagn Cytopathol* 2005;32(5):260-3.

50. Castle PE, Solomon D, Hildesheim A, Herrero R, Conception Bratti M, Sherman ME, *et al.* Stability of archived liquid-based cervical cytologic specimens. *Cancer* 2003;99(2):89-96.

51. Powell N, Smith K, Fiander A. Recovery of human papillomavirus nucleic acids from liquid-based cytology media. *J Virol Methods* 2006;137(1):58-62.

52. Hammou JC. Thin-layer cytology: identification of human papillomavirus by hybridization, capture and signal amplification assay using an alcoholic cell preservative medium. *Acta Cytol* 2007;51(2):193-6.

53. Rabelo-Santos SH, Levi JE, Derchain SF, Sarian LO, Zeferino LC, Messias S, *et al.* DNA recovery from Hybrid Capture II samples stored in specimen transport medium

with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. *J Virol Methods* 2005;126(1-2):197-201.

54. Peevor R, Jones J, Fiander AN, Hibbitts S. Development of optimal liquid based cytology sample processing methods for HPV testing: minimising the 'inadequate' test result. *J Virol Methods* 2011;173(2):374-7.

55. Roberts CC, Swoyer R, Bryan JT, Taddeo FJ. Comparison of real-time multiplex human papillomavirus (HPV) PCR assays with the linear array HPV genotyping PCR assay and influence of DNA extraction method on HPV detection. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1899-906.

56. Dixon EP, Lenz KL, Doobay H, Brown CA, Malinowski DP, Fischer TJ. Recovery of DNA from BD SurePath cytology specimens and compatibility with the Roche AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Test. *J Clin Virol* 2010;48(1):31-5.

Fiche descriptive

Intitulé	Descriptif
Méthode de travail	Évaluation d'une technologie de santé
Date de mise en ligne	Octobre 2013
Date d'édition	Uniquement disponible sous format électronique sur www.has-sante.fr
Objectif(s)	- Identifier l'impact sur la qualité des résultats du non respect des bonnes pratiques de la technique de recherche et/ou de génotypage des HPV - Définir les bonnes pratiques de réalisation permettant de garantir la qualité des résultats
Professionnel(s) concerné(s)	Cf. chapitre 3.2
Demandeur	Le Centre national de référence (CNR) des papillomavirus humains (<i>Human Papilloma Virus</i> – HPV)
Promoteur	Haute Autorité de Santé (HAS) : Service évaluation des actes professionnels (SEAP) & Mission Juridique (MJ)
Pilotage du projet	Coordination : Nadia ZEGHARI-SQUALLI, chef de projet, SEAP (chef de service : Michèle MORIN-SURROCA, adjoint au chef de service : Denis-Jean DAVID), en collaboration avec Catherine DELAMARE, chargée de projet, SEAP Analyse juridique : Pauline AUBRY, chef de projet, MJ, sous la responsabilité de Christine VINCENT Secrétariat : Christine MAYOL, assistante, SEAP
Participants	Expertise externe à la HAS : Geneviève AILLET, Christine BERGERON, Christine CLAVEL-CRAVOISIER, Isabelle HEARD, Jean LEVÉQUE, Jean-Luc MERGUI, Hélène PEIGUE-LAFEUILLE, Michèle RIVIÈRE, Jean-Luc SCHMIT, Henri SEVESTRE, Jean-Paul TAAR Cf. chapitre 3.2.3
Recherche documentaire	De novembre 2011 à avril 2013 (stratégie de recherche documentaire décrite en annexe 2) Réalisée par Sophie DESPEYROUX, documentaliste, avec l'aide de Renée CARDOSO, assistante documentaliste, sous la responsabilité de Frédérique PAGÈS, chef du Service documentation - information des publics, et Christine DEVAUD, adjointe au chef de service
Auteurs de l'argumentaire	Nadia ZEGHARI-SQUALLI, chef de projet, SEAP, sous la responsabilité de Denis-Jean DAVID, adjoint au chef de service, SEAP en collaboration avec Catherine DELAMARE, chargée de projet, SEAP Pauline AUBRY, chef de projet, MJ, sous la responsabilité de Christine VINCENT
Validation	Examen par la Commission nationale d'évaluation des dispositifs médicaux et des technologies de santé (CNEDIPTS) : 23 juillet 2013 Collège de la HAS : 2 octobre 2013
Autres formats	Pas d'autre format que le format électronique disponible sur www.has-sante.fr
Documents d'accompagnement	Texte court du rapport d'évaluation technologique, Annexes du rapport d'évaluation technologique, Décision HAS (octobre 2013) disponibles sur www.has-sante.fr

N° ISBN : 978-2-11-138061-5



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