



**HAL**  
open science

# Démarche qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques : application à la validation de deux méthodes qualitatives selon la norme NF EN ISO 15189

Armelle Tassy

► **To cite this version:**

Armelle Tassy. Démarche qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques : application à la validation de deux méthodes qualitatives selon la norme NF EN ISO 15189. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01885591

**HAL Id: dumas-01885591**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01885591>**

Submitted on 2 Oct 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Démarche qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques :  
application à la validation de deux méthodes qualitatives  
selon la norme NF EN ISO 15189**

# **T H È S E**

**Présentée et publiquement soutenue devant**

**LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE**

**Le 17 Octobre 2017**

**Par Madame Armelle TASSY épouse NEGRE**

**Née le 9 janvier 1985 à Toulon (83)**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

**D.E.S. d' ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES**

**Membres du Jury de la Thèse :**

<b>Madame le Professeur FIGARELLA-BRANGER Dominique</b>	<b>Président</b>
<b>Monsieur le Professeur ROLL Patrice</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Monsieur le Professeur LEPIDI Hubert</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Madame le Docteur THOMASSIN-PIANA Jeanne</b>	<b>Assesseur</b>



**Démarche qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques :  
application à la validation de deux méthodes qualitatives  
selon la norme NF EN ISO 15189**

# **T H È S E**

**Présentée et publiquement soutenue devant**

**LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE**

**Le 17 Octobre 2017**

**Par Madame Armelle TASSY épouse NEGRE**

**Née le 9 janvier 1985 à Toulon (83)**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

**D.E.S. d' ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES**

**Membres du Jury de la Thèse :**

<b>Madame le Professeur FIGARELLA-BRANGER Dominique</b>	<b>Président</b>
<b>Monsieur le Professeur ROLL Patrice</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Monsieur le Professeur LEPIDI Hubert</b>	<b>Assesseur</b>
<b>Madame le Docteur THOMASSIN-PIANA Jeanne</b>	<b>Assesseur</b>

# AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

**Président** : Yvon BERLAND

## FACULTE DE MEDECINE

**Doyen** : Georges LEONETTI

**Vice-Doyen aux Affaires Générales** : Patrick DESSI

**Vice-Doyen aux Professions Paramédicales** : Philippe BERBIS

**Assesseurs :**

- \* aux Etudes : Jean-Michel VITON
- \* à la Recherche : Jean-Louis MEGE
- \* aux Prospectives Hospitalo-Universitaires : Frédéric COLLART
- \* aux Enseignements Hospitaliers : Patrick VILLANI
- \* à l'Unité Mixte de Formation Continue en Santé : Fabrice BARLESI
- \* pour le Secteur Nord : Stéphane BERDAH
- \* aux centres hospitaliers non universitaire : Jean-Noël ARGENSON

**Chargés de mission :**

- \* 1<sup>er</sup> cycle : Jean-Marc DURAND et Marc BARTHET
- \* 2<sup>ème</sup> cycle : Marie-Aleth RICHARD
- \* 3<sup>ème</sup> cycle DES/DESC : Pierre-Edouard FOURNIER
- \* Licences-Masters-Doctorat : Pascal ADALIAN
- \* DU-DIU : Véronique VITTON
- \* Stages Hospitaliers : Franck THUNY
- \* Sciences Humaines et Sociales : Pierre LE COZ
- \* Préparation à l'ECN : Aurélie DAUMAS
- \* Démographie Médicale et Filiarisation : Roland SAMBUC
- \* Relations Internationales : Philippe PAROLA
- \* Etudiants : Arthur ESQUER

**Responsable administratif :**

- \* Déborah ROCCHICCIOLI

**Chefs de service :**

- \* Communication : Laetitia DELOUIS
- \* Examens : Marie-Thérèse ZAMMIT
- \* Intérieur : Joëlle FAVREGA
- \* Maintenance : Philippe KOCK
- \* Scolarité : Christine GAUTHIER

### DOYENS HONORAIRES

M. Yvon BERLAND  
M. André ALI CHERIF  
M. Jean-François PELLISSIER

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM	AGOSTINI Serge	MM	GALLAIS Hervé
	ALDIGHIERI René		GAMERRE Marc
	ALLIEZ Bernard		GARCIN Michel
	AQUARON Robert		GARNIER Jean-Marc
	ARGEME Maxime		GAUTHIER André
	ASSADOURIAN Robert		GERARD Raymond
	AUTILLO-TOUATI Amapola		GEROLAMI-SANTANDREA André
	BAILLE Yves		GIUDICELLI Roger
	BARDOT Jacques		GIUDICELLI Sébastien
	BARDOT André		GOUDARD Alain
	BERARD Pierre		GOUIN François
	BERGOIN Maurice		GRISOLI François
	BERNARD Dominique		GROULIER Pierre
	BERNARD Jean-Louis		HADIDA/SAYAG Jacqueline
	BERNARD Pierre-Marie		HASSOUN Jacques
	BERTRAND Edmond		HEIM Marc
	BISSET Jean-Pierre		HOUEL Jean
	BLANC Bernard		HUGUET Jean-François
	BLANC Jean-Louis		JAQUET Philippe
	BOLLINI Gérard		JAMMES Yves
	BONGRAND Pierre		JOUBE Paulette
	BONNEAU Henri		JUHAN Claude
	BONNOIT Jean		JUIN Pierre
	BORY Michel		KAPHAN Gérard
	BOURGEADE Augustin		KASBARIAN Michel
	BOUVENOT Gilles		KLEISBAUER Jean-Pierre
	BOUYALA Jean-Marie		LACHARD Jean
	BREMOND Georges		LAFFARGUE Pierre
	BRICOT René		LEVY Samuel
	BRUNET Christian		LOUCHET Edmond
	BUREAU Henri		LOUIS René
	CAMBOULIVES Jean		LUCIANI Jean-Marie
	CANNONI Maurice		MAGALON Guy
	CARTOUZOU Guy		MAGNAN Jacques
	CAU Pierre		MALLAN- MANCINI Josette
	CHAMLIAN Albert		MALMEJAC Claude
	CHARREL Michel		MATTEI Jean François
	CHOUX Maurice		MERCIER Claude
	CIANFARANI François		METGE Paul
	CLEMENT Robert		MICHOTÉY Georges
	COMBALBERT André		MILLET Yves
	CONTE-DEVOLX Bernard		MIRANDA François
	CORRIOL Jacques		MONFORT Gérard
	COULANGE Christian		MONGES André
	DALMAS Henri		MONGIN Maurice
	DE MICO Philippe		MONTIES Jean-Raoul
	DEVIN Robert		NAZARIAN Serge
	DEVRED Philippe		NICOLI René
	DJIANE Pierre		NOIRCLERC Michel
	DONNET Vincent		OLMER Michel
	DUCASSOU Jacques		OREHEK Jean
	DUFOUR Michel		PAPY Jean-Jacques
	DUMON Henri		PAULIN Raymond
	FARNARIER Georges		PELOUX Yves
	FAVRE Roger		PENAUD Antony

	FIECHI Marius	PENE Pierre
	FIGARELLA Jacques	PIANA Lucien
	FONTES Michel	PICAUD Robert
	FRANCOIS Georges	PIGNOL Fernand
	FUENTES Pierre	POGGI Louis
	GABRIEL Bernard	POITOUT Dominique
	GALINIER Louis	PONCET Michel
MM	POYEN Danièle	
	PRIVAT Yvan	
	QUILICHINI Francis	
	RANQUE Jacques	
	RANQUE Philippe	
	RICHAUD Christian	
	ROCHAT Hervé	
	ROHNER Jean-Jacques	
	ROUX Hubert	
	ROUX Michel	
	RUFO Marcel	
	SAHEL José	
	SALAMON Georges	
	SALDUCCI Jacques	
	SAN MARCO Jean-Louis	
	SANKALE Marc	
	SARACCO Jacques	
	SARLES Jean-Claude	
	SCHIANO Alain	
	SCOTTO Jean-Claude	
	SEBAHOUN Gérard	
	SERMENT Gérard	
	SERRATRICE Georges	
	SOULAYROL René	
	STAHL André	
	TAMALET Jacques	
	TARANGER-CHARPIN Colette	
	THOMASSIN Jean-Marc	
	UNAL Daniel	
	VAGUE Philippe	
	VAGUE/JUHAN Irène	
	VANUXEM Paul	
	VERVLOET Daniel	
	VIALETES Bernard	
	VIGOUROUX Robert	
	WEILLER Pierre-Jean	

## PROFESSEURS HONORIS CAUSA

### 1967

MM. les  
Professeurs DADI (Italie)  
CID DOS SANTOS (Portugal)

### 1974

MM. les  
Professeurs MAC ILWAIN (Grande-Bretagne)  
T.A. LAMBO (Suisse)

### 1975

MM. les  
Professeurs O. SWENSON (U.S.A.)  
Lord J.WALTON of DETCHANT (Grande-  
Bretagne)

### 1976

MM. les  
Professeurs P. FRANCHIMONT (Belgique)  
Z.J. BOWERS (U.S.A.)

### 1977

MM. les  
Professeurs C. GAJDUSEK-Prix Nobel (U.S.A.)  
C.GIBBS (U.S.A.)  
J. DACIE (Grande-Bretagne)

### 1978

M. le Président F. HOUPHOUET-BOIGNY (Côte d'Ivoire)

### 1980

MM. les  
Professeurs A. MARGULIS (U.S.A.)  
R.D. ADAMS (U.S.A.)

### 1981

MM. les  
Professeurs H. RAPPAPORT (U.S.A.)  
M. SCHOU (Danemark)  
M. AMENT (U.S.A.)  
Sir A. HUXLEY (Grande-Bretagne)  
S. REFSUM (Norvège)

### 1982

M. le Professeur W.H. HENDREN (U.S.A.)

### 1985

MM. les  
Professeurs S. MASSRY (U.S.A.)  
KLINSMANN (R.D.A.)

### 1986

MM. les  
Professeurs E. MIHICH (U.S.A.)



T. MUNSAT (U.S.A.)  
LIANA BOLIS (Suisse)  
L.P. ROWLAND (U.S.A.)

**1987**

M. le Professeur P.J. DYCK (U.S.A.)

**1988**

MM. les  
Professeurs R. BERGUER (U.S.A.)  
W.K. ENGEL (U.S.A.)  
V. ASKANAS (U.S.A.)  
J. WEHSTER KIRKLIN (U.S.A.)  
A. DAVIGNON (Canada)  
A. BETTARELLO (Brésil)

**1989**

M. le Professeur P. MUSTACCHI (U.S.A.)

**1990**

MM. les  
Professeurs J.G. MC LEOD (Australie)  
J. PORTER (U.S.A.)

**1991**

MM. les  
Professeurs J. Edward MC DADE (U.S.A.)  
W. BURGDORFER (U.S.A.)

**1992**

MM. les  
Professeurs H.G. SCHWARZACHER (Autriche)  
D. CARSON (U.S.A.)  
T. YAMAMURO (Japon)

**1994**

MM. les  
Professeurs G. KARPATI (Canada)  
W.J. KOLFF (U.S.A.)

**1995**

MM. les  
Professeurs D. WALKER (U.S.A.)  
M. MULLER (Suisse)  
V. BONOMINI (Italie)

**1997**

MM. les  
Professeurs C. DINARELLO (U.S.A.)  
D. STULBERG (U.S.A.)  
A. MEIKLE DAVISON (Grande-Bretagne)  
P.I. BRANEMARK (Suède)

**1998**

MM. les  
Professeurs O. JARDETSKY (U.S.A.)

**1999**

MM. les  
Professeurs

J. BOTELLA LLUSIA (Espagne)  
D. COLLEN (Belgique)  
S. DIMAURO (U. S. A.)

**2000**

MM. les  
Professeurs

D. SPIEGEL (U. S. A.)  
C. R. CONTI (U.S.A.)

**2001**

MM. les  
Professeurs

P-B. BENNET (U. S. A.)  
G. HUGUES (Grande Bretagne)  
J-J. O'CONNOR (Grande Bretagne)

**2002**

MM. les  
Professeurs

M. ABEDI (Canada)  
K. DAI (Chine)

**2003**

M. le Professeur  
Sir

T. MARRIE (Canada)  
G.K. RADDI (Grande Bretagne)

**2004**

M. le Professeur

M. DAKE (U.S.A.)

**2005**

M. le Professeur

L. CAVALLI-SFORZA (U.S.A.)

**2006**

M. le Professeur

A. R. CASTANEDA (U.S.A.)

**2007**

M. le Professeur

S. KAUFMANN (Allemagne)

## EMERITAT

### 2013

M. le Professeur	BRANCHEREAU Alain	31/08/2016
M. le Professeur	CARAYON Pierre	31/08/2016
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2016
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2016
M. le Professeur	HENRY Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	LE GUICHAOUA Marie-Roberte	31/08/2016
M. le Professeur	RUFO Marcel	31/08/2016
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2016

### 2014

M. le Professeur	FUENTES Pierre	31/08/2017
M. le Professeur	GAMERRE Marc	31/08/2017
M. le Professeur	MAGALON Guy	31/08/2017
M. le Professeur	PERAGUT Jean-Claude	31/08/2017
M. le Professeur	WEILLER Pierre-Jean	31/08/2017

### 2015

M. le Professeur	COULANGE Christian	31/08/2018
M. le Professeur	COURAND François	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2016
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2016
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2016

### 2016

M. le Professeur	BONGRAND Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2017
M. le Professeur	BRUNET Christian	31/08/2019
M. le Professeur	CAU Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2017
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2017
M. le Professeur	FONTES Michel	31/08/2019
M. le Professeur	JAMMES Yves	31/08/2019
M. le Professeur	NAZARIAN Serge	31/08/2019
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2017
M. le Professeur	POITOUT Dominique	31/08/2019
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2017
M. le Professeur	VIALETES Bernard	31/08/2019

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AGOSTINI FERRANDES Aubert	CHARPIN Denis Surnombre	GORINCOUR Guillaume
ALBANESE Jacques	CHAUMOITRE Kathia	GRANEL/REY Brigitte
ALESSANDRINI Pierre Surnombre	CHAUVEL Patrick Surnombre	GRILLO Jean-Marie Surnombre
ALIMI Yves	CHINOT Olivier	GRIMAUD Jean-Charles
AMABILE Philippe	CHOSSEGROS Cyrille	GROB Jean-Jacques
AMBROSI Pierre	CLAVERIE Jean-Michel Surnombre	GUEDJ Eric
ARGENSON Jean-Noël	COLLART Frédéric	GUIEU Régis
ASTOUL Philippe	COSTELLO Régis	GUIS Sandrine
ATTARIAN Shahram	COURBIERE Blandine	GUYE Maxime
AUDOUIN Bertrand	COWEN Didier	GUYOT Laurent
AUFFRAY Jean-Pierre Surnombre	CRAVELLO Ludovic	GUYS Jean-Michel
AUQUIER Pascal	CUISSET Thomas	HABIB Gilbert
AVIERINOS Jean-François	CURVALE Georges	HARDWIGSEN Jean
AZORIN Jean-Michel	DA FONSECA David	HARLE Jean-Robert
AZULAY Jean-Philippe	DAHAN-ALCARAZ Laetitia	HOFFART Louis
BAILLY Daniel	DANIEL Laurent	HOUVENAEGHEL Gilles
BARLESI Fabrice	DARMON Patrice	JACQUIER Alexis
BARLIER-SETTI Anne	D'ERCOLE Claude	JOLIVET/BADIER Monique
BARTHET Marc	D'JOURNO Xavier	JOUVE Jean-Luc
BARTOLI Jean-Michel	DEHARO Jean-Claude	KAPLANSKI Gilles
BARTOLI Michel	DELARQUE Alain	KARSENTY Gilles
BARTOLIN Robert Surnombre	DELPERO Jean-Robert	KERBAUL François
BARTOLOMEI Fabrice	DENIS Danièle	LAFFORGUE Pierre
BASTIDE Cyrille	DESSEIN Alain Surnombre	LANCON Christophe
BENSOUSSAN Laurent	DESSI Patrick	LA SCOLA Bernard
BERBIS Philippe	DISDIER Patrick	LAUGIER René
BERDAH Stéphane	DODDOLI Christophe	LAUNAY Franck
BERLAND Yvon	DRANCOURT Michel	LAVIEILLE Jean-Pierre
BERNARD Jean-Paul	DUBUS Jean-Christophe	LE CORROLLER Thomas
BEROUD Christophe	DUFFAUD Florence	LE TREUT Yves-Patrice Surnombre
BERTUCCI François	DUFOUR Henry	LECHEVALLIER Eric
BLAISE Didier	DURAND Jean-Marc	LEGRE Régis
BLIN Olivier	DUSSOL Bertrand	LEHUCHER-MICHEL Marie- Pascale
BLONDEL Benjamin	ENJALBERT Alain	LEONE Marc
BONIN/GUILLAUME Sylvie	EUSEBIO Alexandre	LEONETTI Georges
BONELLO Laurent	FAKHRY Nicolas	LEPIDI Hubert
BONNET Jean-Louis	FAUGERE Gérard	LEVY Nicolas
BOTTA Alain Surnombre	FELICIAN Olivier	MACE Loïc
BOTTA/FRIDLUND Danielle	FENOLLAR Florence	MAGNAN Pierre-Edouard
BOUBLI Léon	FIGARELLA/BRANGER Dominique	MARANINCHI Dominique Surnombre
BOYER Laurent	FLECHER Xavier	MARTIN Claude Surnombre
BREGEON Fabienne	FOURNIER Pierre-Edouard	MATONTI Frédéric
BRETELLE Florence	FRAISSE Alain Disponibilité	MEGE Jean-Louis
BROUQUI Philippe	FRANCES Yves Surnombre	MERROT Thierry
BRUDER Nicolas	FRANCESCHI Frédéric	METZLER/GUILLEMAIN Catherine
BRUE Thierry	FUENTES Stéphane	MEYER/DUTOUR Anne
BRUNET Philippe	GABERT Jean	MICCALEF/ROLL Joëlle
BURTEY Stéphane	GAINNIER Marc	MICHEL Fabrice

CARCOPINO-TUSOLI Xavier  
CASANOVA Dominique  
CASTINETTI Frédéric  
CECCALDI Mathieu  
CHABOT Jean-Michel  
CHAGNAUD Christophe  
CHAMBOST Hervé  
CHAMPSAUR Pierre  
CHANEZ Pascal  
CHARAFFE-JAUFFRET  
Emmanuelle  
CHARREL Rémi

CHIARONI Jacques  
NICOLLAS Richard  
OLIVE Daniel  
OUAFIK L'Houcine  
PAGANELLI Franck  
PANUEL Michel  
PAPAZIAN Laurent  
PAROLA Philippe  
PARRATTE Sébastien  
PAUT Olivier  
PELISSIER-ALICOT Anne-Laure  
PELLETIER Jean  
PETIT Philippe  
PHAM Thao  
PIARROUX Renaud  
PIERCECCHI/MARTI Marie-  
Dominique  
PIQUET Philippe  
PIRRO Nicolas  
POINSO François  
POUGET Jean Surnombre  
RACCAH Denis  
RAOULT Didier  
REGIS Jean  
REYNAUD/GAUBERT Martine

GARCIA Stéphane  
GARIBOLDI Vlad  
GAUDART Jean  
GENTILE Stéphanie  
GERBEAUX Patrick  
GEROLAMI/SANTANDREA René  
GILBERT/ALESSI Marie-Christine  
GIORGI Roch  
GIOVANNI Antoine

GIRARD Nadine  
GIRAUD/CHABROL Brigitte

GONCALVES Anthony  
REYNAUD Rachel  
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth  
RIDINGS Bernard Surnombre  
ROCHE Pierre-Hugues  
ROCH Antoine  
ROCHWERGER Richard  
ROLL Patrice  
ROSSI Dominique  
ROSSI Pascal  
ROUDIER Jean  
SALAS Sébastien  
SAMBUC Roland  
SARLES Jacques  
SARLES/PHILIP Nicole

SASTRE Bernard Surnombre  
SCAVARDA Didier  
SCHLEINIZ Nicolas  
SEBAG Frédéric  
SEITZ Jean-François  
SERRATRICE Jacques  
SIELEZNEFF Igor  
SIMON Nicolas  
STEIN Andréas

MICHEL Gérard  
MICHELET Pierre  
MILH Mathieu  
MOAL Valérie  
MONCLA Anne  
MORANGE Pierre-Emmanuel  
MOULIN Guy  
MOUTARDIER Vincent  
MUNDLER Olivier

NAUDIN Jean  
NICCOLI/SIRE Patricia  
NICOLAS DE LAMBALLERIE  
Xavier  
TAIEB David  
THIRION Xavier  
THOMAS Pascal  
THUNY Franck  
TRIGLIA Jean-Michel  
TROPIANO Patrick  
TSIMARATOS Michel  
TURRINI Olivier  
VALERO René  
VEY Norbert  
VIDAL Vincent  
VIENS Patrice  
VILLANI Patrick  
VITON Jean-Michel

VITTON Véronique  
VIEHWEGER Heide Elke  
VIVIER Eric  
XERRI Luc

## PROFESSEUR DES UNIVERSITES

ADALIAN Pascal  
AGHABABIAN Valérie  
BELIN Pascal  
CHABANNON Christian  
CHABRIERE Eric  
FERON François  
LE COZ Pierre  
LEVASSEUR Anthony  
RANJEVA Jean-Philippe  
SOBOL Hagay

**PROFESSEUR CERTIFIE**

BRANDENBURGER Chantal

**PRAG**

TANTI-HARDOUIN Nicolas

**PROFESSEUR ASSOCIE DE MEDECINE GENERALE A MI-TEMPS**

FILIPPI Simon

**PROFESSEUR ASSOCIE A TEMPS  
PARTIEL**

ALTAVILLA Annagrazia  
BURKHART Gary

## MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITE - PRATICIEN HOSPITALIER

ACHARD Vincent	FABRE Alexandre	MOTTOLA GHIGO Giovanna
ANDRE Nicolas	FOUILLOUX Virginie	NGUYEN PHONG Karine
ANGELAKIS Emmanouil	FRERE Corinne	NINOVE Laetitia
ATLAN Catherine	GABORIT Bénédicte	NOUGAIREDE Antoine
BACCINI Véronique	GASTALDI Marguerite	OUDIN Claire
BARTHELEMY Pierre	GAUDY/MARQUESTE Caroline	OVAERT Caroline
BARTOLI Christophe	GELSI/BOYER Véronique	PAULMYER/LACROIX Odile
BEGE Thierry	GIUSIANO Bernard	PERRIN Jeanne
BELIARD Sophie	GIUSIANO COURCAMBECK Sophie	RANQUE Stéphane
BERBIS Julie	GOURIET Frédérique	REY Marc
BERGE-LEFRANC Jean-Louis	GRAILLON Thomas	ROBAGLIA/SCHLUPP Andrée
BEYER-BERJOT Laura	GREILLIER Laurent	ROBERT Philippe
BOUCRAUT Joseph	GRISOLI Dominique	SABATIER Renaud
BOULAMERY Audrey	GUIDON Catherine	SARI-MINODIER Irène
BOULLU/CIOCCA Sandrine	HAUTIER/KRAHN Aurélie	SARLON-BARTOLI Gabrielle
BUFFAT Christophe	HRAIECH Sami	SAVEANU Alexandru
CALAS/AILLAUD Marie-Françoise	JOURDE CHICHE Noémie	SECQ Véronique
CAMILLERI Serge	KASPI-PEZZOLI Elise	SOULA Gérard
CARRON Romain	KRAHN Martin	TOGA Caroline
CASSAGNE Carole	L'OLLIVIER Coralie	TOGA Isabelle
		TREBUCHON/DA FONSECA Agnès
CHAUDET Hervé	LABIT-BOUVIER Corinne	TROUSSE Delphine
COZE Carole	LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina	VALLI Marc
DADOUN Frédéric (disponibilité)	LAGIER Aude	VELLY Lionel
DALES Jean-Philippe	LAGIER Jean-Christophe	VELY Frédéric
DAUMAS Aurélie	LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude	VION-DURY Jean
DEGEORGES/VITTE Joëlle	LEVY/MOZZICONACCI Annie	ZATTARA/CANNONI Hélène
DEL VOLGO/GORI Marie-José	LOOSVELD Marie	
DELLIAUX Stéphane	MANCINI Julien	
DESPLAT/JEGO Sophie	MARY Charles	
DEVEZE Arnaud Disponibilité	MASCAUX Céline	
DUFOUR Jean-Charles	MAUES DE PAULA André	
EBBO Mikaël	MILLION Matthieu	

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

(mono-appartenants)

ABU ZAINEH Mohammad	DESNUES Benoît	STEINBERG Jean-Guillaume
BARBACARU/PERLES T. A.	LIMERAT/BOUDOURESQUE Françoise	THOLLON Lionel
BERLAND/BENHAIM Caroline	MARANINCHI Marie	THIRION Sylvie
BERAUD/JUVEN Evelyne (retraite octobre 2016)	MERHEJ/CHAUVEAU Vicky	
BOUCAULT/GARROUSTE Françoise	MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte	
BOYER Sylvie	POGGI Marjorie	
DEGIOANNI/SALLE Anna	RUEL Jérôme	

## MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

GENTILE Gaëtan

**MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE à MI-TEMPS**

ADNOT Sébastien  
BARGIER Jacques  
BONNET Pierre-André  
CALVET-MONTREDON Céline  
GUIDA Pierre  
JANCZEWSKI Aurélie

**MAITRE DE CONFERENCES  
ASSOCIE à MI-TEMPS**

REVIS Joana



**PROFESSEURS ET MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS****PROFESSEURS ASSOCIES, MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (mono-appartenants)****ANATOMIE 4201**

CHAMPSAUR Pierre (PU-PH)  
LE CORROLLER Thomas (PU-PH)  
PIRRO Nicolas (PU-PH)

LAGIER Aude (MCU-PH)

THOLLON Lionel (MCF) (60ème section)

**ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES 4203**

CHARAFE/JAUFFRET Emmanuelle (PU-PH)  
DANIEL Laurent (PU-PH)  
FIGARELLA/BRANGER Dominique (PU-PH)  
GARCIA Stéphane (PU-PH)  
XERRI Luc (PU-PH)

DALES Jean-Philippe (MCU-PH)  
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie (MCU PH)  
LABIT/BOUVIER Corinne (MCU-PH)  
MAUES DE PAULA André (MCU-PH)  
SECQ Véronique (MCU-PH)

**ANTHROPOLOGIE 20**

ADALIAN Pascal (PR)

DEGIOANNI/SALLE Anna (MCF)

**BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE 4501**

CHARREL Rémi (PU PH)  
DRANCOURT Michel (PU-PH)  
FENOLLAR Florence (PU-PH)  
FOURNIER Pierre-Edouard (PU-PH)  
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier (PU-PH)  
LA SCOLA Bernard (PU-PH)  
RAOULT Didier (PU-PH)

ANGELAKIS Emmanouil (MCU-PH)  
GOURIET Frédérique (MCU-PH)  
NOUGAIREDE Antoine (MCU-PH)  
NINOVE Laetitia (MCU-PH)

CHABRIERE Eric (PR) (64ème section)  
LEVASSEUR Anthony (PR) (64ème section)  
DESNUES Benoit (MCF) ( 65ème section )  
MERHEJ/CHAUVEAU Vicky (MCF) (87ème section)

**ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE ;  
MEDECINE URGENCE 4801**

ALBANESE Jacques (PU-PH)  
AUFFRAY Jean-Pierre (PU-PH) Surnombre  
BRUDER Nicolas (PU-PH)  
KERBAUL François (PU-PH)  
LEONE Marc (PU-PH)  
MARTIN Claude (PU-PH) Surnombre  
MICHEL Fabrice (PU-PH)  
MICHELET Pierre (PU-PH)  
PAUT Olivier (PU-PH)

GUIDON Catherine (MCU-PH)  
VELLY Lionel (MCU-PH)

**BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE 4401**

BARLIER/SETTI Anne (PU-PH)  
ENJALBERT Alain (PU-PH)  
GABERT Jean (PU-PH)  
GUIEU Régis (PU-PH)  
OUAFIK L'Houcine (PU-PH)

BUFFAT Christophe (MCU-PH)  
MOTTOLA GHIGO Giovanna (MCU-PH)  
SAVEANU Alexandru (MCU-PH)

**ANGLAIS 11**

BRANDENBURGER Chantal (PRCE)

BURKHART Gary (PAST)

**BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT  
ET DE LA REPRODUCTION ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5405**

METZLER/GUILLEMAIN Catherine (PU-PH)

PERRIN Jeanne (MCU-PH)

**BIOLOGIE CELLULAIRE 4403**

ROLL Patrice (PU-PH)

GASTALDI Marguerite (MCU-PH)

KASPI-PEZZOLI Elise (MCU-PH)

LEVY/MOZZICONNACCI Annie (MCU-PH)

ROBAGLIA/SCHLUPP Andrée (MCU-PH)

**BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE 4301**

GUEDJ Eric (PU-PH)

GUYE Maxime (PU-PH)

MUNDLER Olivier (PU-PH)

TAIEB David (PU-PH)

BELIN Pascal (PR) (69ème section)

RANJEVA Jean-Philippe (PR) (69ème section)

CAMMILLERI Serge (MCU-PH)

VION-DURY Jean (MCU-PH)

BARBACARU/PERLES Téodora Adriana (MCF) (69ème section)

**BIostatistiques, Informatique Médicale  
ET Technologies de Communication 4604**

CLAVERIE Jean-Michel (PU-PH) Surnombre

GAUDART Jean (PU-PH)

GIORGI Roch (PU-PH)

CHAUDET Hervé (MCU-PH)

DUFOUR Jean-Charles (MCU-PH)

GIUSIANO Bernard (MCU-PH)

MANCINI Julien (MCU-PH)

SOULA Gérard (MCU-PH)

ABU ZAINEH Mohammad (MCF) (5ème section)

BOYER Sylvie (MCF) (5ème section)

**CARDIOLOGIE 5102**

AVIERINOS Jean-François (PU-PH)

BONELLO Laurent (PU PH)

BONNET Jean-Louis (PU-PH)

CUISSSET Thomas (PU-PH)

DEHARO Jean-Claude (PU-PH)

FRAISSE Alain (PU-PH) Disponibilité

FRANCESCHI Frédéric (PU-PH)

HABIB Gilbert (PU-PH)

PAGANELLI Franck (PU-PH)

THUNY Franck (PU-PH)

**CHIRURGIE DIGESTIVE 5202**

BERDAH Stéphane (PU-PH)

HARDWIGSEN Jean (PU-PH)

LE TREUT Yves-Patrice (PU-PH) Surnombre

SASTRE Bernard (PU-PH) Surnombre

SIELEZNEFF Igor (PU-PH)

BEYER BERJOT Laura (MCU-PH)

**CHIRURGIE GENERALE 5302**

DELPERO Jean-Robert (PU-PH)

MOUTARDIER Vincent (PU-PH)

SEBAG Frédéric (PU-PH)

TURRINI Olivier (PU-PH)

BEGE Thierry (MCU-PH)

**CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE 5002**

ARGENSON Jean-Noël (PU-PH)  
BLONDEL Benjamin (PU-PH)  
CURVALE Georges (PU-PH)  
FLECHER Xavier (PU PH)  
PARRATTE Sébastien (PU-PH)  
ROCHWERGER Richard (PU-PH)  
TROPANO Patrick (PU-PH)

**CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE 4702**

BERTUCCI François (PU-PH)  
CHINOT Olivier (PU-PH)  
COWEN Didier (PU-PH)  
DUFFAUD Florence (PU-PH)  
GONCALVES Anthony PU-PH)  
HOUVENAEGHEL Gilles (PU-PH)  
MARANINCHI Dominique (PU-PH) Surnombre  
SALAS Sébastien (PU-PH)  
VIENS Patrice (PU-PH)  
SABATIER Renaud (MCU-PH)

**CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE 5103**

COLLART Frédéric (PU-PH)  
D'JOURNO Xavier (PU-PH)  
DODDOLI Christophe (PU-PH)  
GARIBOLDI Vlad (PU-PH)  
MACE Loïc (PU-PH)  
THOMAS Pascal (PU-PH)

FOUILLOUX Virginie (MCU-PH)  
GRISOLI Dominique (MCU-PH)  
TROUSSE Delphine (MCU-PH)

**CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE 5104**

ALIMI Yves (PU-PH)  
AMABILE Philippe (PU-PH)  
BARTOLI Michel (PU-PH)  
MAGNAN Pierre-Edouard (PU-PH)  
PIQUET Philippe (PU-PH)

SARLON BARTOLI Gabrielle (MCU PH)

**HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE 4202**

GRILLO Jean-Marie (PU-PH) Surnombre  
LEPIDI Hubert (PU-PH)  
ACHARD Vincent (MCU-PH)  
PAULMYER/LACROIX Odile (MCU-PH)

**CHIRURGIE INFANTILE 5402**

ALESSANDRINI Pierre (PU-PH) Surnombre  
GUYS Jean-Michel (PU-PH)  
JOUVE Jean-Luc (PU-PH)  
LAUNAY Franck (PU-PH)  
MERROT Thierry (PU-PH)  
VIEHWEGER Heide Elke (PU-PH)

**CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE 5503**

CHOSSEGROS Cyrille (PU-PH)  
GUYOT Laurent (PU-PH)

**CHIRURGIE PLASTIQUE,  
RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE ; BRÛLOLOGIE 5004**

CASANOVA Dominique (PU-PH)  
LEGRE Régis (PU-PH)

HAUTIER/KRAHN Aurélie (MCU-PH)

**GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE ; ADDICTOLOGIE 5201**

BARTHET Marc (PU-PH)  
BERNARD Jean-Paul (PU-PH)  
BOTTA-FRIDLUND Danielle (PU-PH)  
DAHAN-ALCARAZ Laetitia (PU-PH)  
GEROLAMI-SANTANDREA René (PU-PH)  
GRIMAUD Jean-Charles (PU-PH)  
LAUGIER René (PU-PH)  
SEITZ Jean-François (PU-PH)  
VITTON Véronique (PU-PH)

**GENETIQUE 4704****DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE 5003**

BERBIS Philippe (PU-PH)  
 GROB Jean-Jacques (PU-PH)  
 RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth (PU-PH)

GAUDY/MARQUESTE Caroline (MCU-PH)

BEROUD Christophe (PU-PH)

LEVY Nicolas (PU-PH)  
 MONCLA Anne (PU-PH)  
 SARLES/PHILIP Nicole (PU-PH)

KRAHN Martin (MCU-PH)  
 NGYUEN Karine (MCU-PH)  
 TOGA Caroline (MCU-PH)

**ENDOCRINOLOGIE ,DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES ;  
GYNECOLOGIE MEDICALE 5404**

BRUE Thierry (PU-PH)  
 CASTINETTI Frédéric (PU-PH)  
 NICCOLI/SIRE Patricia (PU-PH)

ZATTARA/CANNONI Hélène (MCU-PH)

**GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5403****EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION 4601**

AUQUIER Pascal (PU-PH)  
 BOYER Laurent (PU-PH)  
 CHABOT Jean-Michel (PU-PH)  
 GENTILE Stéphanie (PU-PH)  
 SAMBUC Roland (PU-PH)  
 THIRION Xavier (PU-PH)

AGOSTINI Aubert (PU-PH)  
 BOUBLI Léon (PU-PH)  
 BRETELLE Florence (PU-PH)  
 CARCOPINO-TUSOLI Xavier (PU-PH)  
 COURBIERE Blandine (PU-PH)  
 CRAVELLO Ludovic (PU-PH)  
 D'ERCOLE Claude (PU-PH)

BERBIS Julie (MCU-PH)  
 LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude (MCU-PH)

MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte (MCF)(06ème section)  
 TANTI-HARDOUIN Nicolas (PRAG)

**IMMUNOLOGIE 4703**

KAPLANSKI Gilles (PU-PH)  
 MEGE Jean-Louis (PU-PH)  
 OLIVE Daniel (PU-PH)  
 VIVIER Eric (PU-PH)

FERON François (PR) (69ème section)

BOUCRAUT Joseph (MCU-PH)  
 DEGEORGES/VITTE Joëlle (MCU-PH)  
 DESPLAT/JEGO Sophie (MCU-PH)  
 ROBERT Philippe (MCU-PH)  
 VELY Frédéric (MCU-PH)

BERAUD/JUVEN Evelyne (MCF) 65ème section) (retraite octobre 2016)

BOUCAULT/GARROUSTE Françoise (MCF) 65ème section)

**HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION 4701**

BLAISE Didier (PU-PH)  
 COSTELLO Régis (PU-PH)  
 CHIARONI Jacques (PU-PH)  
 GILBERT/ALESSI Marie-Christine (PU-PH)  
 MORANGE Pierre-Emmanuel (PU-PH)  
 VEY Norbert (PU-PH)

BACCINI Véronique (MCU-PH)  
 CALAS/AILLAUD Marie-Françoise (MCU-PH)  
 FRERE Corinne (MCU-PH)  
 GELSI/BOYER Véronique (MCU-PH)  
 LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina (MCU-PH)  
 POGGI Marjorie (MCF) (64ème section)

**MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE 4603**

LEONETTI Georges (PU-PH)  
PELISSIER/ALICOT Anne-Laure (PU-PH)  
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique (PU-PH)

**MALADIES INFECTIEUSES ; MALADIES TROPICALES 4503**

BROUQUI Philippe (PU-PH)  
PAROLA Philippe (PU-PH)  
STEIN Andréas (PU-PH)

BARTOLI Christophe (MCU-PH)

BERLAND/BENHAIM Caroline (MCF) (1ère section)

LAGIER Jean-Christophe (MCU-PH)  
MILLION Matthieu (MCU-PH)

**MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION 4905****MEDECINE INTERNE ; GERIATRIE ET BIOLOGIE DU  
VIEILLISSEMENT ; MEDECINE GENERALE ; ADDICTOLOGIE 5301**

BENSOUSSAN Laurent (PU-PH)  
DELARQUE Alain (PU-PH)

BONIN/GUILLAUME Sylvie (PU-PH)  
DISDIER Patrick (PU-PH)  
DURAND Jean-Marc (PU-PH)  
FRANCES Yves (PU-PH) Surnombre  
GRANEL/REY Brigitte (PU-PH)  
HARLE Jean-Robert (PU-PH)  
ROSSI Pascal (PU-PH)  
SCHLEINITZ Nicolas (PU-PH)  
SERRATRICE Jacques (PU-PH) disponibilité  
  
EBBO Mikael (MCU-PH)

VITON Jean-Michel (PU-PH)

**MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL 4602**

BOTTA Alain (PU-PH) Surnombre  
LEHUCHER/MICHEL Marie-Pascale (PU-PH)  
  
BERGE-LEFRANC Jean-Louis (MCU-PH)  
SARI/MINODIER Irène (MCU-PH)

GENTILE Gaëtan (MCF Méd. Gén. Temps plein)

**NEPHROLOGIE 5203**

FILIPPI Simon (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)

BERLAND Yvon (PU-PH)  
BRUNET Philippe (PU-PH)  
BURTEY Stéphanne (PU-PH)  
DUSSOL Bertrand (PU-PH)  
MOAL Valérie (PU-PH)  
  
JOURDE CHICHE Noémie (MCU PH)

ADNOT Sébastien (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)  
BARGIER Jacques (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)  
BONNET Pierre-André (MCF associé Méd. Gén à mi-temps)  
CALVET-MONTREDON Céline (MCF associé Méd. Gén. à temps plein)  
GUIDA Pierre (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)

**NUTRITION 4404****NEUROCHIRURGIE 4902**

DARMON Patrice (PU-PH)  
RACCAH Denis (PU-PH)  
VALERO René (PU-PH)

DUFOUR Henry (PU-PH)  
FUENTES Stéphane (PU-PH)  
REGIS Jean (PU-PH)  
ROCHE Pierre-Hugues (PU-PH)  
SCAVARDA Didier (PU-PH)

ATLAN Catherine (MCU-PH)  
BELIARD Sophie (MCU-PH)

CARRON Romain (MCU PH)  
GRAILLON Thomas (MCU PH)

MARANINCHI Marie (MCF) (66ème section)

<b>ONCOLOGIE 65 (BIOLOGIE CELLULAIRE)</b>	<b>NEUROLOGIE 4901</b>
CHABANNON Christian (PR) (66ème section) SOBOL Hagay (PR) (65ème section)	ATTARIAN Sharham (PU PH) AUDOIN Bertrand (PU-PH) AZULAY Jean-Philippe (PU-PH) CECCALDI Mathieu (PU-PH) EUSEBIO Alexandre (PU-PH)
<b>OPHTALMOLOGIE 5502</b>	FELICIAN Olivier (PU-PH) PELLETIER Jean (PU-PH) POUGET Jean (PU-PH) Surnombre
DENIS Danièle (PU-PH) HOFFART Louis (PU-PH) MATONTI Frédéric (PU-PH) RIDINGS Bernard (PU-PH) Surnombre	<b>PEDOPSYCHIATRIE; ADDICTOLOGIE 4904</b>
<b>OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE 5501</b>	DA FONSECA David (PU-PH) POINSO François (PU-PH)
DESSI Patrick (PU-PH) FAKHRY Nicolas (PU-PH) GIOVANNI Antoine (PU-PH) LAVIEILLE Jean-Pierre (PU-PH) NICOLLAS Richard (PU-PH) TRIGLIA Jean-Michel (PU-PH)  DEVEZE Arnaud (MCU-PH) Disponibilité  REVIS Joana (MAST) (Orthophonie) (7ème Section)  ROMAN Stéphane (Professeur associé des universités mi-temps)	<b>PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE - PHARMACOLOGIE CLINIQUE; ADDICTOLOGIE 4803</b>
<b>PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE 4502</b>	BLIN Olivier (PU-PH) FAUGERE Gérard (PU-PH) MICALLEF/ROLL Joëlle (PU-PH) SIMON Nicolas (PU-PH)  BOULAMERY Audrey (MCU-PH) VALLI Marc (MCU-PH)
DESSEIN Alain (PU-PH) PIARROUX Renaud (PU-PH)  CASSAGNE Carole (MCU-PH) L'OLLIVIER Coralie (MCU-PH) MARY Charles (MCU-PH) RANQUE Stéphane (MCU-PH) TOGA Isabelle (MCU-PH)	<b>PHILOSOPHIE 17</b>
<b>PEDIATRIE 5401</b>	LE COZ Pierre (PR) (17ème section)  ALTAVILLA Annagrazia (PR Associé à mi-temps)
CHAMBOST Hervé (PU-PH) DUBUS Jean-Christophe (PU-PH) GIRAUD/CHABROL Brigitte (PU-PH) MICHEL Gérard (PU-PH) MILH Mathieu (PU-PH) REYNAUD Rachel (PU-PH) SARLES Jacques (PU-PH) TSIMARATOS Michel (PU-PH)  ANDRE Nicolas (MCU-PH)	<b>PHYSIOLOGIE 4402</b>  BARTOLOMEI Fabrice (PU-PH) BREGEON Fabienne (PU-PH) CHAUVEL Patrick (PU-PH) Surnombre JOLIVET/BADIER Monique (PU-PH) MEYER/DUTOUR Anne (PU-PH)  BARTHELEMY Pierre (MCU-PH) BOULLU/CIOCCA Sandrine (MCU-PH) DADOUN Frédéric (MCU-PH) (disponibilité) DEL VOLGO/GORI Marie-José (MCU-PH)

COZE Carole (MCU-PH)  
FABRE Alexandre (MCU-PH)  
OUDIN Claire (MCU-PH)  
OVAERT Caroline (MCU-PH)

DELLIAUX Stéphane (MCU-PH)  
GABORIT Bénédicte (MCU-PH)  
REY Marc (MCU-PH)  
TREBUCHON/DA FONSECA Agnès (MCU-PH)

**PSYCHIATRIE D'ADULTES ; ADDICTOLOGIE 4903**

AZORIN Jean-Michel (PU-PH)  
BAILLY Daniel (PU-PH)  
LANCON Christophe (PU-PH)  
NAUDIN Jean (PU-PH)

LIMERAT/BOUDOURESQUE Françoise (MCF) (40ème section)  
RUEL Jérôme (MCF) (69ème section)  
STEINBERG Jean-Guillaume (MCF) (66ème section)  
THIRION Sylvie (MCF) (66ème section)

**PSYCHOLOGIE - PSYCHOLOGIE CLINIQUE, PCYCHOLOGIE SOCIALE 16**

AGHABABIAN Valérie (PR)

**PNEUMOLOGIE; ADDICTOLOGIE 5101**

**RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE 4302**

BARTOLI Jean-Michel (PU-PH)  
CHAGNAUD Christophe (PU-PH)  
CHAUMOITRE Kathia (PU-PH)  
GIRARD Nadine (PU-PH)  
GORINCOUR Guillaume (PU-PH)  
JACQUIER Alexis (PU-PH)  
MOULIN Guy (PU-PH)  
PANUEL Michel (PU-PH)  
PETIT Philippe (PU-PH)  
VIDAL Vincent (PU-PH)

ASTOUL Philippe (PU-PH)  
BARLESI Fabrice (PU-PH)  
CHANEZ Pascal (PU-PH)  
CHARPIN Denis (PU-PH) Surnombre  
REYNAUD/GAUBERT Martine (PU-PH)

GREILLIER Laurent (MCU PH)  
MASCAUX Céline (MCU-PH)

TOMASINI Pascale (Maitre de conférences associé des universités)

**THERAPEUTIQUE; MEDECINE D'URGENCE; ADDICTOLOGIE 4804**

**REANIMATION MEDICALE ; MEDECINE URGENCE 4802**

GAINNIER Marc (PU-PH)  
GERBEAUX Patrick (PU-PH)  
PAPAZIAN Laurent (PU-PH)  
ROCH Antoine (PU-PH)

AMBROSI Pierre (PU-PH)  
BARTOLIN Robert (PU-PH) Surnombre  
VILLANI Patrick (PU-PH)

DAUMAS Aurélie (MCU-PH)

HRAIECH Sami (MCU-PH)

**UROLOGIE 5204**

**RHUMATOLOGIE 5001**

GUIS Sandrine (PU-PH)  
LAFFORGUE Pierre (PU-PH)  
PHAM Thao (PU-PH)  
ROUDIER Jean (PU-PH)

BASTIDE Cyrille (PU-PH)  
KARSENTY Gilles (PU-PH)  
LECHEVALLIER Eric (PU-PH)  
ROSSI Dominique (PU-PH)

## Remerciements

### **A Madame le Professeur Dominique FIGARELLA-BRANGER,**

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous en suis très reconnaissante. Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez témoignée pour le choix de ce sujet et la mise en pratique au sein de votre service, ainsi que pour vos enseignements en neuropathologie pendant mon internat.

### **A Monsieur le Professeur Hubert LEPIDI,**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Vos enseignements ont été très précieux pour moi.

### **A Monsieur le Professeur Patrice ROLL,**

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'y apporter votre expertise.

### **Au Docteur Jeanne THOMASSIN-PIANA,**

Je te remercie infiniment d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Tu m'as fait lire mon tout premier cas, je m'en souviens comme si c'était hier. Merci pour tout ce que tu m'as appris.



**Au Docteur Marie-Christine ROJAT-HABIB**, merci pour vos conseils, votre aide et le temps passé à la correction de mon travail. Votre soutien et votre disponibilité ont été indispensables, je vous en suis très reconnaissante. Merci aussi pour vos précieux enseignements.

**Au Docteur Flora POIZAT**, j'ai eu la chance de réaliser la première partie de ce travail avec toi. Merci pour tes conseils, ta patience, ta bonne humeur et tout ce que tu m'as appris.

**A Karine ACHACHE**, je te remercie pour nos échanges, ton aide dans la réalisation de ce travail et tes relectures « super express » de documents.

**A Lorena SCAPPUCCINI et Elisabeth PASQUALE**, pour votre implication dans ce travail. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer les aspects techniques de la cytologie, d'avoir réalisé les essais avec tant de sérieux et d'avoir répondu à mes très nombreuses questions.

**A Sophie FORNEROD**, pour nos « 5 minutes qualité » quotidiennes, je sais que tu y es devenue totalement accro ! Merci beaucoup pour ton aide.

**A Francine AZARIO-CHEILLAN, Florence FRANCHI et Pauline VRIGNAUD**, merci pour votre aide pour la première partie de ce travail, j'ai beaucoup apprécié travailler avec vous, toujours dans la joie et la bonne humeur.

**A l'ensemble des pathologistes de l'Institut Paoli-Calmettes** avec qui j'ai eu la chance de faire mes débuts en anapath : aux Professeurs Luc XERRI et Emmanuelle CHARAFE-JAUFFRET, aux Docteurs Bruno CHETAILLE, Jocelyne JACQUEMIER et Geneviève MONGE qui m'ont initiée au monde merveilleux de l'anapath. Et à ceux qui les ont rejoints et que j'ai eu la chance de connaître, Maria PACIENCIA-GROS et Lenaig MESCAM-MANCINI. Merci pour le partage de votre expérience, j'ai beaucoup appris à vos côtés.

**A l'ensemble des pathologistes que j'ai connu à l'hôpital de la Timone**, aux Professeur Laurent Daniel et aux Docteurs Corinne BOUVIER, Anne BLANC, André MAUES DE PAULA, Julia TORRENTS, Philippe GAUCHER, Jean DEL GRANDE, Wassim ESSAMET, Anne-Laure CHESNAIS. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.

**A l'ensemble des pathologistes que j'ai connu à l'hôpital Nord**, au Professeur Stéphane GARCIA et aux Docteurs Jean-Philippe DALES, Amina DJEMLI, Sophie GUISIANO, Véronique SECQ et Julia VILLERET. Merci pour les savoirs que vous m'avez transmis.

**A l'ensemble des équipes des laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques de l'Institut Paoli-Calmettes, de l'hôpital de la Timone et de l'hôpital Nord**, j'ai beaucoup apprécié travailler avec vous au cours de mon internat.

**Aux internes** qui m'ont accompagnée au cours de toutes ces années...et elles furent nombreuses !!

En particulier, à Stéphanie DELABRE, nous avons ramé ensemble pour notre premier semestre d'internat, partagé des soirées à dicter des comptes rendus interminables, dormi en staff sur nos repos de garde... Si j'en garde malgré tout un bon souvenir c'est en grande partie grâce à toi.

A Seb et Nico qui m'ont accueillie lors de mon premier semestre en anapath et qui m'ont convaincue de faire un droit au remord à coup de « ouai'han, c'est trop bien'han, trop cool'han ».

Et enfin à mes co-internes de ce dernier choix, Geoffroy, Maeva, Manon G., Manon E., Hugo et Hussam, pour toutes nos discussions métaphysiques entre deux coups de couteau, aussi bien en macro qu'au déjeuner !

**A tous mes amis présents et passés** qui m'ont accompagnée au cours de ma vie.

Tout particulièrement à Isabelle et Audrey. Je n'ose même pas compter les années, ça nous vieillira trop ! Malgré le temps et la distance c'est toujours aussi chouette de vous retrouver.

A Majo', Fiona et Marlène, grâce à vous j'ai passé un externat extraordinaire et tant de soirées déjantées !

**A ma grande sœur**, ma teuteu, ma teut', je suis contente d'être ta petite sœur. Je n'oublie pas, bien sûr, tes tentatives d'extorsion de fonds, lorsque tu m'échangeais mes pièces en « argent » contre tes pièces en « or »... Mais, hormis cela, tu as été une super grande sœur ! Même si nous ne nous voyions pas souvent, je pense beaucoup à toi.

**A mon papa**, merci pour tout ce que tu m'as donné. La vie bien sûr, mais aussi tout ce que tu m'as appris et transmis. Nous avons, et avons encore parfois, un peu de mal à nous comprendre, mais je sais que nous nous aimons tous les deux très fort.

**A ma maman**, j'aurais tellement aimé que tu sois là pour me « serrer les pouces » et me soutenir comme toi seule savais le faire. Nous avons prévu de passer cette thèse ensemble et ton absence aujourd'hui est particulièrement amère pour moi.

Merci d'avoir toujours été présente, de m'avoir tant donné et de m'avoir laissé grandir avec tant de bienveillance. Tu as été pour moi la maman parfaite qui aime, qui écoute, qui console, qui rassure, qui encourage, qui explique, qui comprend, qui laisse expérimenter la vie parce que « il faut que jeunesse se passe » mais qui est toujours là ensuite pour aider à réparer ce qui doit l'être. J'espère pouvoir donner autant à mes enfants et tisser avec eux des liens aussi forts.

Tu me manqueras toute ma vie.

**A mon « petit » Paulin**, mon amour, mon dou', merci d'être chaque jour à mes côtés, merci pour ton amour, ta patience et ton écoute. Je ne sais pas si quelqu'un d'autre sur terre serait capable d'écouter avec tant d'attention mes états d'âme, mes doutes perpétuels et toutes mes questions existentielles. Depuis 12 ans, quel chemin parcouru ! Nous avons toujours réussi à évoluer ensemble en restant sur la même « longueur d'onde », en partageant les mêmes valeurs, en poursuivant les mêmes idéaux, les mêmes rêves et projets... en espérant qu'ils se concrétisent !

C'est, je pense, notre plus grande force.

Je t'aime !

**A ma Douce et à mon Valentinou.** Devenir votre maman est la plus belle aventure que j'ai vécu dans ma vie, parfois difficile, mais tellement extraordinaire !

Je n'aurais jamais imaginé que partager la vie avec vous serait aussi fort. Vous aider à naître, vous porter, vous allaiter, vous sentir, partager nos nuits et nos lits, essayer de graver dans ma mémoire chaque regard, chaque sourire, vos premiers pas, vos premiers mots et vous observer grandir et apprendre chaque jour est une source d'émerveillement inépuisable.

Je vous aime jusqu'au bout du monde, et retour !

**Et enfin merci aux Shadoks** qui, il y a déjà 40 ans, avaient imaginé l'accréditation et en avaient tiré un proverbe : « Pourquoi faire simple quand on peut faire de la qualité ? »

# **SOMMAIRE**

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. GENERALITES .....</b>	<b>3</b>
<b>A. Historique de la qualité .....</b>	<b>3</b>
1. L'émergence du contrôle qualité.....	3
2. Qualité totale et assurance qualité.....	4
<b>B. Cadre légal.....</b>	<b>6</b>
1. Qualité dans le domaine de la santé et certification par la HAS .....	6
2. Réforme de la biologie médicale et accréditation par le COFRAC .....	7
3. Le flou juridique concernant l'ACP .....	10
<b>C. Démarche qualité et accréditation en ACP.....</b>	<b>11</b>
1. En France.....	11
2. En Europe .....	12
<b>III. REFERENTIELS ET METHODOLOGIE.....</b>	<b>14</b>
<b>A. Analyse des documents de référence .....</b>	<b>14</b>
1. La Norme NF EN ISO 15189 : Laboratoire de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence .....	15
2. Définition des portées d'accréditation : SH REF 08 et SH INF 50 .....	18
3. Guides techniques .....	21
<b>B. La vérification/validation des méthodes doit s'intégrer dans la         démarche globale d'amélioration continue du laboratoire :         approche processus .....</b>	<b>24</b>
<b>C. Méthodologie pratique de la validation des méthodes en ACP.....</b>	<b>28</b>
1. Choisir la méthode à valider et faire un état des lieux.....	28
2. Mettre au point la technique, si nécessaire.....	28
3. Planifier le déroulement de la validation .....	29
4. Déterminer les caractéristiques de la méthode pour définir le cadre de la validation et décrire précisément la méthode .....	29
5. Effectuer des recherches bibliographiques .....	30

6. Déterminer les performances attendues, les limites d'acceptabilité et les objectifs analytiques .....	30
7. Choisir l'étalon ou matériau de référence .....	31
8. Faire une analyse de risques et des modalités de maîtrise .....	31
9. Vérifier et actualiser les documents concernés.....	32
10. Déterminer les paramètres à vérifier et mettre au point le plan expérimental.....	32
11. Réaliser les expériences.....	36
12. Analyser les résultats .....	36
13. Conclure et rédiger le dossier .....	36
14. Prévoir le suivi de la méthode .....	37

#### **IV.MISE EN PRATIQUE : la validation appliquée à la coloration standard**

en histologie à l'Institut Paoli-Calmettes .....	39
<b>A. Présentation de la structure et du système institutionnel de la qualité.....</b>	<b>39</b>
1. L'Institut Paoli-Calmettes .....	39
2. Le service d'anatomie et cytologie pathologiques .....	39
3. Le système institutionnel de la qualité .....	40
<b>B. Histoire et principes de l'histologie humaine .....</b>	<b>40</b>
1. Histoire.....	40
2. Principes de l'histologie moderne .....	41
<b>C. Réalisation de la validation .....</b>	<b>42</b>
1. Choix de la méthode et état des lieux.....	42
2. Mise au point de la technique.....	45
3. Planification du déroulement de la validation .....	45
4. Détermination des caractéristiques et description de la méthode .....	47
5. Recherches bibliographiques .....	48
6. Détermination des performances attendues, des limites d'acceptabilité et des objectifs analytiques .....	49
7. Choix du matériau de référence .....	50
8. Analyse des risques et des modalités de maîtrise .....	51
9. Vérification et actualisation des documents concernés .....	52
10. Détermination des paramètres à vérifier et mise au point du	

plan expérimental.....	53
11. Mise en œuvre expérimentale et évaluation des lames test .....	57
12. Résultats .....	57
13. Conclusion et rédaction du dossier .....	59
14. Suivi de la méthode et de la démarche qualité .....	59
D. Le déroulement de l'évaluation COFRAC.....	60
<b>V. MISE EN PRATIQUE : la validation de méthode appliquée à la cytologie cervico-utérine au centre hospitalier de la Timone à Marseille.....</b>	<b>63</b>
<b>A. Présentation de la structure et du système institutionnel de la qualité.....</b>	<b>63</b>
1. L'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille .....	63
2. L'hôpital de la Timone.....	63
3. Le service d'anatomie et cytologie pathologiques et de neuropathologie .....	63
4. Le système institutionnel de la qualité .....	64
<b>B. La cytologie cervico-utérine : un examen incontournable pour le dépistage du cancer du col de l'utérus .....</b>	<b>65</b>
1. Le cancer du col de l'utérus .....	65
2. La cytologie cervico-utérine .....	66
3. Du dépistage individuel au dépistage organisé .....	68
<b>C. Réalisation de la validation .....</b>	<b>70</b>
1. Choix de la méthode et état des lieux.....	70
2. Mise au point de la technique.....	73
3. Planification du déroulement de la validation.....	74
4. Détermination des caractéristiques de la méthode et description .....	76
5. Recherches bibliographiques .....	79
6. Détermination des performances attendues, des limites d'acceptabilité et les objectifs analytiques .....	80
7. Choix du matériel de référence .....	80
8. Analyse des risques et des modalités de maîtrise .....	81
9. Vérification et actualisation des documents concernés .....	84
10. Détermination des paramètres à vérifier et mise au point du plan expérimental.....	84

11. Sélection des échantillons, mise en œuvre expérimentale et évaluation des lames test .....	90
12. Résultats .....	90
13. Conclusion et rédaction du dossier .....	91
14. Suivi de la méthode et de la démarche qualité .....	92
<b>VI.DISCUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>VII.CONCLUSION.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>98</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>102</b>
Annexe 1 : Organigramme du Département de Biologie du Cancer de l'Institut Paoli-Calmettes .....	102
Annexe 2 : Evaluation de la qualité de la coloration standard en histologie dans le service d'Anatomie et cytologie pathologiques de l'Institut Paoli-Calmettes .....	103
Annexe 3 : Dossier de validation de méthode pour la coloration standard en histologie dans le service d'Anatomie et cytologie pathologiques de l'Institut Paoli-Calmettes .....	104
Annexe 4 : Organigramme du service d'Anatomie cytologie pathologiques et de neuropathologie de l'hôpital de la Timone .....	123
Annexe 5 : Evaluation de la qualité du frottis cervico-utérin dans le service d'Anatomie cytologie pathologiques et de neuropathologie de l'hôpital de laTimone .....	124
Annexe 6 : Dossier de validation de méthode pour la cytologie cervico-utérine en milieu liquide dans le service d'Anatomie cytologie pathologique et neuropathologie de l'hôpital de la Timone .....	125
Annexe 7 : Habilitation technicien de cytologie pour le service d'Anatomie cytologie pathologiques et neuropathologie de l'hôpital de la Timone .....	143
Annexe 8 : Habilitation pathologiste lecture FCU pour le service d'Anatomie cytologie pathologiques et neuropathologie de l'hôpital de la Timone .....	144



## I. INTRODUCTION

La qualité des soins est définie par l'OMS comme « une démarche qui doit permettre de garantir à chaque patient la combinaison d'actes diagnostiques et thérapeutiques qui lui assurera le meilleur résultat en terme de santé, conformément à l'état actuel de la science médicale, au meilleur coût pour un même résultat, au moindre risque iatrogène et pour sa plus grande satisfaction en termes de procédures, de résultats et de contacts humains à l'intérieur du système de soins ».

La notion de soins de qualité est très ancienne : le serment d'Hippocrate par exemple, y faisait déjà référence au IV<sup>e</sup> siècle avant J.-C. Mais cette qualité des soins était alors résumée à la qualité des pratiques, auxquelles la formation et la qualification des médecins conféraient une garantie de qualité.

A l'heure actuelle, face à de nouvelles conditions d'exercice et aux exigences de la société, la preuve de la qualité doit désormais être apportée. C'est dans ce but que l'assurance qualité dans le domaine de la santé s'est développée aux Etats-Unis dès les années 50. En France, la démarche s'est mise en place plus tardivement et c'est au début des années 2000 qu'a débuté la certification des établissements de santé sous la responsabilité de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), puis de la Haute Autorité de Santé (HAS).

Plus récemment, l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) français a été rendue obligatoire. Cette accréditation est délivrée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) selon la norme NF EN ISO 15189 (1). Bien que non exigée encore par la loi, plusieurs laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques (ACP) en France, se sont engagés de façon volontaire dans une démarche d'accréditation selon la même norme.

Une des exigences de la norme NF EN ISO 15189 est de vérifier ou de valider les méthodes analytiques employées au laboratoire. Ce travail porte sur la vérification/validation des méthodes en ACP en général et, plus particulièrement, sur la réalisation de deux dossiers de validation de méthodes qualitatives. Le premier dossier a été réalisé en 2015 à l'Institut Paoli-Calmettes (IPC), centre de lutte contre le cancer, situé à Marseille et concerne la coloration standard en histologie. Le second a été réalisé

en 2017 au centre hospitalier de la Timone de l'Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille et porte sur la cytologie cervico-utérine en milieu liquide.

Le choix de ce sujet de thèse a été motivé par un intérêt personnel dans le domaine de la qualité appliquée à l'ACP. Persuadée que l'accréditation des laboratoires d'ACP deviendra obligatoire dans un avenir proche, j'ai souhaité me former aux bases de l'assurance qualité en suivant le Diplôme Universitaire d'Assurance Qualité en Pathologie proposé par l'université de Paris Descartes. Cet enseignement m'a beaucoup apporté et j'ai souhaité le mettre en pratique au cours de mes stages d'internat, en concertation avec les chefs de service de ces deux laboratoires.

Ces 2 méthodes ont été choisies car elles représentent chacune une grande part d'activité au sein d'un laboratoire d'ACP et sont à la base du diagnostic histologique ou cytologique.

Ainsi, l'objectif de ce travail était de préciser les bases méthodologiques de la validation des méthodes appliquée à l'ACP et de les mettre en pratique par la réalisation de deux dossiers de validation.

Dans la première partie, nous aborderons l'histoire de l'assurance qualité et le cadre légal de la certification des établissements de santé et de l'accréditation des laboratoires, ainsi que des généralités sur la démarche qualité et l'accréditation en ACP.

Puis nous aborderons la méthodologie de la validation des méthodes appliquée à l'ACP en analysant les référentiels utilisés, en précisant la place de la vérification/validation des méthodes au sein de la démarche globale d'amélioration continue du laboratoire et en détaillant les différentes étapes de la validation.

Ensuite pour chaque dossier, nous présenterons le service concerné et son système institutionnel de la qualité. Nous décrirons les principes de chacune des méthodes, puis nous ferons un état des lieux de la façon dont elles sont mises en œuvre dans chaque service. Enfin, toutes les étapes suivies pour l'élaboration de chaque dossier de validation seront détaillées.

Nous finirons par une discussion sur la mise en place de cette démarche au sein des deux services, les bénéfices et les difficultés rencontrées.

## II. GENERALITES

### A. Historique de la qualité

#### 1. L'émergence du contrôle qualité

La notion de qualité est très ancienne dans l'évolution de l'Homme mais les origines du concept de qualité, tel que nous le concevons aujourd'hui, remonte à l'avènement de l'ère industrielle moderne, à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, début du 20<sup>ème</sup> siècle.

Ce sont en effet les débuts de la production de masse et de la rationalisation du travail, impulsés notamment par Frederick Winslow Taylor et Henry Ford, qui ont marqué l'émergence du concept de qualité. La qualité était alors confinée au contrôle de la conformité du produit fini.

En France, en 1916, Henri Fayol, ingénieur civil des mines, pionnier de la gestion d'entreprise et du management, conceptualise dans un ouvrage intitulé *Administration industrielle et générale*, les 5 principes fondamentaux de l'administration : prévoir, organiser, commander, coordonner, et contrôler. Le contrôle n'est plus uniquement fait sur le produit fini mais comporte aussi une analyse des erreurs dans le processus de production pour y apporter les corrections nécessaires (2).

En 1926, l'Association Française de Normalisation (AFNOR) est créée, ainsi que la Fédération internationale des associations nationales de normalisation, qui deviendra ensuite l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) en 1947.

Dans les années 1931, aux Etats-Unis, Walter A. Shewhart, physicien et statisticien, directeur technique de l'entreprise de télécommunication Bell Telephone Laboratories, publie les résultats de ses travaux (3) qui visent à définir de façon scientifique une démarche qualité. Il propose une approche organisée de la gestion de la qualité qui s'installe tout au long de la production, le but étant d'intégrer la démarche qualité dès la phase initiale de fabrication du produit.

Pendant la Seconde Guerre mondiale, l'essor des entreprises américaines d'armement participe à l'amélioration du concept de qualité. William Edwards Deming, Joseph Juran et Walter A. Shewhart travaillent ensemble pour améliorer la productivité et la qualité du

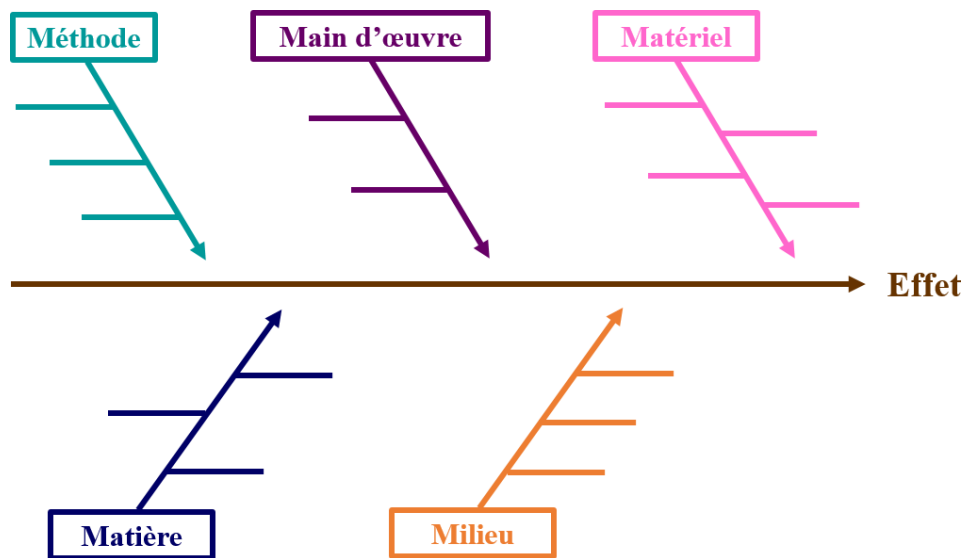
matériel de guerre et mettent au point un programme de formation à la maîtrise de la qualité. En 1959, l'armée américaine publie la première norme d'assurance qualité.

## 2. Qualité totale et assurance qualité

Les concepts de qualité totale et d'assurance qualité émergent au Japon, où, dès la fin de la Seconde Guerre mondiale, est créée la JUSE (Japanese Union of Scientists and Engineers : Union des Scientifiques et Ingénieurs Japonais) qui avait pour mission de réfléchir à la compétitivité des produits nippons. Cet organisme invita les experts américains de la qualité, William Edwards Deming, Joseph Juran et Walter A. Shewhart pour enseigner aux industriels japonais les bases du management par la qualité.

Puis Armand V. Feigenbaum introduit au Japon le Total Quality Management, qui établit les bases de la gestion intégrale de la qualité. Il définit la maîtrise totale de la qualité comme un système destiné à intégrer efficacement les efforts des divers groupes d'une organisation afin de développer, de maintenir et d'améliorer la qualité de façon permanente.

Après cet apprentissage de la qualité occidentale, les japonais se lancèrent dans plus de deux décennies de pratique et de développement des méthodes de management de la qualité. Le professeur Kaoru Ishikawa formalise et diffuse auprès de toute l'industrie ce nouveau courant de pensée. Il refuse l'idée que le management concerne uniquement les ingénieurs et propose d'intégrer aussi les ouvriers. Il fonde les cercles de la qualité, petits groupes de travail appartenant à la même unité, qui se réunissent volontairement et régulièrement pour identifier et tenter de résoudre les problèmes affectant leur secteur de l'entreprise. En 1962, il écrit un manuel sur la maîtrise de la qualité (4), portant notamment sur les outils de résolution de problème, dont le plus connu est le diagramme causes-effets, appelé aussi diagramme d'Ishikawa, ou diagramme 5M (pour Matériel, Méthode, Milieu, Main d'œuvre, Matière). Il s'agit de représenter de façon graphique les causes pouvant aboutir à un effet pour repérer les causes d'un dysfonctionnement et ensuite essayer de les résoudre (**Figure 1**).



**Figure 1. Diagramme causes-effets ou diagramme 5M.**

Ce n'est qu'en 1980, que les occidentaux, devant l'ampleur du succès des entreprises japonaises, ont commencé à remettre en question leurs pratiques de gestion de la qualité pour intégrer la vision préventive développée au Japon.

Dans les années quatre-vingt, les principaux pays industrialisés participent à la rédaction de **normes internationales** pour l'assurance de la qualité au sein de l'ISO. Il en existe actuellement plus de 20000. Ces normes définissent « des exigences, des lignes directrices ou des caractéristiques dont le but est de garantir un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné » (5). Une entreprise peut alors faire appel à un organisme indépendant pour faire reconnaître sa conformité à une norme, c'est la **certification**. La norme la plus utilisée dans le monde est la *Norme ISO 9001 : Systèmes de management de la qualité*. Elle repose sur un certain nombre de principes de management de la qualité, notamment une forte orientation client, la motivation et l'engagement de la direction, l'approche processus et l'amélioration continue. **L'approche processus** propose de décomposer toute l'activité de l'entreprise en processus, chacun comportant un ensemble d'activités transformant des éléments d'entrée en éléments de sortie. Nous détaillerons plus longuement cette notion dans la partie méthodologie.

## **B. Cadre légal**

### **1. Qualité dans le domaine de la santé et certification par la HAS**

Comme nous l'avons vu, les démarches qualité se sont développées en premier lieu dans le domaine industriel. Néanmoins, la qualité des soins a toujours été un élément de préoccupation dans le domaine de la santé.

Le développement de l'assurance qualité dans ce domaine a débuté aux Etats Unis avec la création de la Joint Commission on Accreditation of Health Care Organisation, dans les années 50. En France la certification des établissements de santé a été initiée en 1999 sous la responsabilité de l'ANAES, puis de la HAS.

**La HAS** est une autorité publique indépendante à caractère scientifique qui a pour but de contribuer à la régulation du système de santé par la qualité et l'efficience. Créée par la loi française du 13 août 2004 relative à l'assurance maladie, ses missions portent notamment sur l'évaluation des produits de santé et des pratiques professionnelles, mais aussi sur l'organisation des soins et de la santé publique, pour assurer à tous les patients un accès pérenne et équitable à des soins aussi efficaces, sûrs et efficients que possible.

**La certification des établissements de santé** est une procédure d'évaluation externe rendue obligatoire pour tout établissement, quelle que soit sa taille et son activité. Elle est indépendante de l'établissement et de ses organismes de tutelle et porte sur le niveau des prestations et soins délivrés aux patients et la dynamique d'amélioration de la qualité et de la sécurité des soins mise en œuvre par les établissements. La première procédure de certification, débutée en 1999, visait à promouvoir la mise en œuvre de démarches d'amélioration continue de la qualité. Actuellement, se déroule la 4<sup>ème</sup> version de cette certification, dont les objectifs sont de mesurer le niveau de qualité atteint, de renforcer la maîtrise des risques et de rendre continue la démarche d'amélioration de la qualité dans les établissements de santé.

## 2. Réforme de la biologie médicale et accréditation par le COFRAC

### a) Réforme de la biologie médicale

La dernière réforme de la biologie médicale a été officialisée le 21 juillet 2009 dans la loi « hôpital, patients, santé, territoires » (6). Cette réforme porte notamment sur la mise en place d'une procédure d'accréditation des LBM. Elle est l'aboutissement de plusieurs rapports réalisés depuis le milieu des années 2000. Deux d'entre eux ont été déterminants : un rapport de l'Inspection Générale des Affaires Sociales (IGAS) en 2006 et le rapport dit « Ballereau » en 2008.

**Le rapport de l'IGAS** intitulé *La biologie médicale libérale en France : bilan et perspectives* (7) visait à dresser un état des lieux de la biologie médicale. Il est le premier à souligner « la nécessité de réformer la biologie médicale en constatant que, malgré un niveau global satisfaisant de qualité des examens, il reste des insuffisances non compatibles avec les besoins en matière de santé publique », surtout dans des laboratoires à faible activité. De son point de vue, « la seule garantie objective de qualité semble être la certification et l'accréditation des laboratoires de biologie médicale par un organisme tiers ». L'IGAS propose donc d'imposer le respect de la qualité comme principale norme, en se référant dans un premier temps au *Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale* (GBEA) qui était déjà fixé par arrêté, puis en rendant obligatoire l'accréditation selon la norme ISO 15189.

**Le rapport « Ballereau »** (8) a été remis en 2008 au ministère de la Santé. Il reprend les conclusions de l'IGAS, notamment le fait que la régulation du système de santé des LBM doit reposer sur la qualité. Il propose d'augmenter le niveau d'exigence défini par le GBEA et de se diriger vers une « qualité prouvée » en incitant à évoluer vers l'accréditation obligatoire.

La parution de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale a rendu obligatoire cette accréditation et concernait également les structures d'ACP qui « réalisent des actes d'anatomie et cytologie pathologiques à l'aide de techniques relevant de la biologie médicale ». Cette formulation, très ambiguë, a soulevé beaucoup d'interrogations au sein de la spécialité d'ACP et nous y reviendrons plus loin.

## b) L'accréditation par le COFRAC

L'accréditation des LBM se fait selon une norme spécifique, la norme NF EN ISO 15189 intitulée *Laboratoire de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence*, dont la première version a été publiée en 2003.

**L'accréditation** est une « procédure selon laquelle un organisme faisant autorité fournit une reconnaissance formelle qu'une organisation est compétente pour réaliser des tâches spécifiques » (1). Cette procédure vise à garantir la fiabilité des examens grâce à une vérification de la compétence par des pairs indépendants de la structure à accréditer, avec le soutien de qualitatifs.

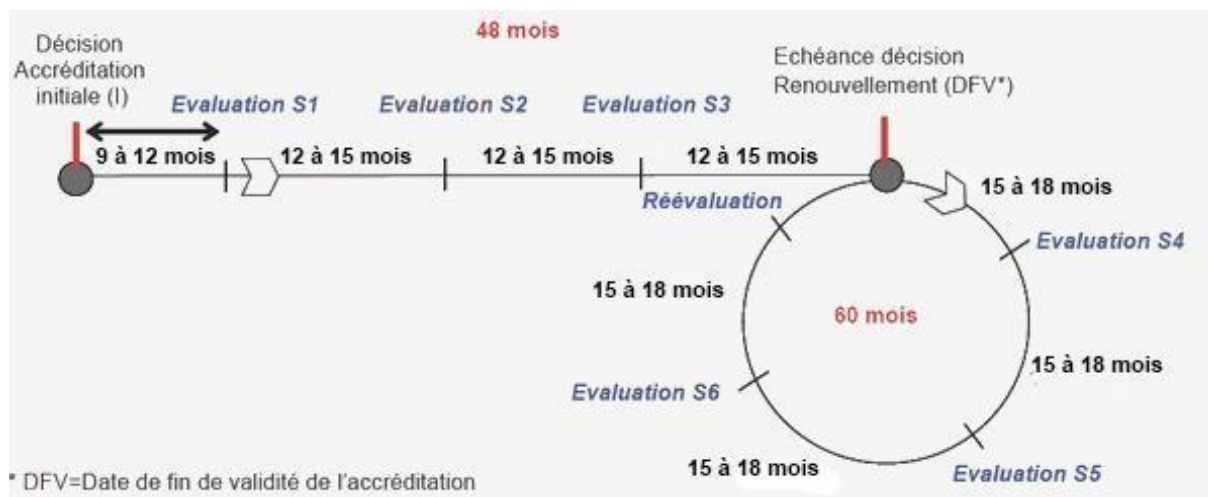
Elle porte sur toutes les phases de réalisation de l'examen, non seulement sur la phase analytique mais également sur les phases pré-analytique (prélèvement et transport jusqu'au lieu de l'analyse) et post-analytique (interprétation biologique, validation, compte rendu).

L'accréditation est délivrée par un organisme national d'accréditation. En France, il s'agit du **COFRAC** (Comité Français d'Accréditation), association à but non lucratif, créée en 1994. Il comporte depuis 2009 une section « Santé Humaine » dédiée, entre autres, à l'accréditation des laboratoires.

Le cycle d'accréditation est standardisé et comprend une visite initiale d'évaluation suivie de trois évaluations de surveillance. Puis, quatre ans après la visite initiale, une première réévaluation a lieu. L'accréditation est ensuite renouvelée tous les cinq ans avec trois visites de surveillance entre chaque renouvellement (**Figure 2**).

La demande initiale d'accréditation peut porter sur un périmètre restreint de l'activité du laboratoire. En effet, la demande d'accréditation se fait pour une ou plusieurs « portée(s) d'accréditation ». Une **portée d'accréditation** est l'énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire est accrédité (ou demande à l'être).





**Figure 2. Cycle de vie d'une accréditation** (d'après SH REF 05 : Règlement d'accréditation (9))

L'accréditation repose sur des évaluations réalisées par des pairs. Les évaluateurs dits « techniques » sont des médecins ou pharmaciens, qui ont une bonne expérience en qualité et en audit. Ils sont accompagnés par des évaluateurs qualitatifs.

A l'issue de l'évaluation, les évaluateurs exposent les **points forts** relevés et les éventuels **écarts** et **axes d'amélioration**.

**Un écart** est une non-satisfaction à des critères explicites ou implicites du référentiel d'accréditation. Il est dit « **critique** » s'il remet en cause la fiabilité des résultats ou le bon fonctionnement du laboratoire. Il est dit « **non critique** » si le risque induit sur la qualité des résultats et/ou le fonctionnement du laboratoire est faible. Cette appréciation est de la responsabilité de l'évaluateur.

Les **axes d'amélioration** sont des propositions pour optimiser la démarche qualité.

Le laboratoire a la possibilité de contester et même de refuser les écarts relevés. Les rapports d'évaluation font ensuite l'objet d'un examen collégial par le Comité Technique d'Evaluation constitué de personnes n'ayant pas participé à ladite évaluation. C'est le directeur générale du COFRAC qui délivre la décision finale d'accréditation. Il peut suspendre ou retirer l'accréditation si les critères ne sont plus satisfaits.

### 3. Le flou juridique concernant l'ACP

L'ordonnance du 13 janvier 2010 a créé beaucoup d'interrogations au sein de la spécialité d'ACP, relayées notamment par le Syndicat des Médecins Pathologistes Français (SMPF).

En effet, avant cette ordonnance, l'article L6211-1 du *Code de la santé publique* concernant les LBM excluait de la définition des actes de biologie « les actes d'anatomie et de cytologie pathologiques exécutés par les médecins spécialistes de cette discipline ». L'ordonnance du 13 janvier 2010 et la modification du *Code de la santé publique* qui s'en est suivie enlevait cette dernière phrase, entraînant la confusion entre les deux spécialités. De plus, l'accréditation était rendue obligatoire pour « les actes d'ACP réalisés à l'aide de techniques relevant de la biologie médicale », mais sans définir ni identifier clairement ces actes.

A l'initiative du SMPF, une pétition réunissant 738 signatures de pathologistes français a été adressée au ministre de la Santé en décembre 2010 pour demander à clarifier ces ambiguïtés. La même année, le Conseil National Professionnel des Pathologistes (CNPath) est créé, fédération réunissant 10 associations, sociétés et syndicats de pathologistes français. La spécialité, fédérée au sein de ce conseil, sollicite le ministère de la Santé sur deux demandes : exclure l'ACP de l'ordonnance du 13 janvier 2010 et constituer un groupe de travail pour aborder les problèmes spécifiques à la spécialité.

Ces demandes trouveront une suite favorable auprès du ministère et un groupe de travail est constitué, piloté par la Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS), qui rendra son rapport en avril 2012 (10). Ce rapport évoque une « confusion persistante avec la biologie » et préconise de prévoir un cadre juridique spécifique, adapté à l'ACP et dissocié de la biologie.

Concernant la démarche qualité, trois options sont envisagées dans ce rapport :

- « 1. publier, sous forme d'arrêté, les bonnes pratiques en ACP selon l'ancien modèle de la biologie médicale (GBEA) ;
2. rendre obligatoire une certification des structures d'ACP selon la norme ISO 9001 ou selon un autre référentiel ;
3. rendre obligatoire une accréditation selon une norme internationale en vigueur. »

C'est cette troisième proposition qui sera retenue et les conclusions du rapport préconisent « d'engager progressivement la discipline dans une démarche d'accréditation selon la norme 15189 avec un guide technique d'adaptation propre à l'ACP, en fixant le périmètre des techniques à évaluer et le calendrier de la démarche ».

Enfin, dans la loi définitive du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale (11), l'article L. 6211-1 est, à nouveau, complété par les mots : « hormis les actes d'anatomie et de cytologie pathologiques exécutés par des médecins spécialistes dans ce domaine » et l'article L6221-1 précise que l'accréditation est « obligatoire pour les LBM réalisant des examens d'anatomie et de cytologie pathologiques figurant soit à la nomenclature des actes de biologie médicale, soit à la nomenclature générale des actes professionnels », levant le flou juridique sur l'obligation d'accréditation des laboratoires d'ACP.

Ainsi, les laboratoires d'ACP ne sont actuellement pas soumis à une accréditation obligatoire et la démarche relève d'un engagement volontaire.

## **C. Démarche qualité et accréditation en ACP**

### **1. En France**

Depuis déjà une trentaine d'année les pathologistes français se préoccupent de l'introduction de la démarche qualité dans leurs pratiques.

La profession elle-même a souhaité initier cette démarche de façon autonome en créant en 1990 l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques (AFAQAP). C'est une association à but non lucratif, ouverte à tous les professionnels des structures d'ACP publiques et privées. Plus de 80 % des laboratoires d'ACP ont un adhérent à l'AFAQAP. Elle est engagée dans une démarche d'accréditation ISO 17043 comme Organisme de Comparaison Interlaboratoires et dispose d'un agrément de formation continue.

Dès 1998, l'association éditait pour la première fois des *Recommandations de Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques* (RBPACP) (12) et, la même année, la

thématique de l'assurance qualité était inscrite pour la première fois dans le programme d'un congrès, aux Assises de pathologie d'Angers.

L'association organise chaque année une trentaine d'évaluations externes de qualité (EEQ) portant sur l'organisation des structures, les diagnostics et les techniques. La participation est volontaire et individuelle.

Elle met au point des référentiels de pratiques, comme les RBPACP (12) et le guide *Gestion d'une structure d'ACP* (13), ainsi que des documents à l'usage des professionnels de l'ACP sur des sujets spécifiques portant sur la qualité des pratiques.

L'AFAQAP, en partenariat avec l'ANAES puis la HAS, s'est également engagée dans la rédaction de référentiels d'évaluation des pratiques professionnelles (EPP).

Enfin des rencontres professionnelles et des formations dans le domaine de la qualité en ACP sont régulièrement organisées.

Ainsi, la profession est déjà engagée dans une démarche d'assurance qualité et quelques laboratoires ont choisi d'initier une démarche d'accréditation. La première accréditation d'un laboratoire d'ACP français selon la norme 15189 a été délivrée en 2011 par le COFRAC et au 1<sup>er</sup> Aout 2017, 17 laboratoires d'ACP sont accrédités pour une ou plusieurs analyse(s) (14).

## **2. En Europe**

Une enquête sur l'accréditation en ACP dans l'Union Européenne a été publiée en 2015 (15) par le groupe de travail du Conseil des Pathologistes de l'European Union of Medical Specialists (Union Européenne des Médecins Spécialistes, qui représente les médecins spécialistes au Conseil de l'Europe).

Un questionnaire concernant la démarche d'accréditation a été élaboré par les représentants français de ce conseil et soumis aux autres membres représentant les autres états. Les réponses ont permis de disposer des informations pour 20 pays.

Il ressortait de cette enquête que l'accréditation en ACP est réglementaire en Lituanie (depuis 2012), au Danemark (2010) et en Grande Bretagne (2014). En Belgique, un

décret Royal l'a rendue obligatoire peu de temps après l'enquête, portant à 4 le nombre de pays où l'accréditation est obligatoire en Europe. Dans les autres pays l'accréditation relève, comme en France, d'une démarche volontaire. Les normes choisies sont majoritairement l'ISO 15189 ou des normes mixtes 15189/9001. L'Allemagne et la Turquie ont choisi l'ISO 17020 (norme des structures d'expertises). Les Allemands ont inclus, en plus, un audit de l'exactitude diagnostique par leurs pairs. La Lituanie et le Danemark utilisent des documents propres.

La mise en place d'un système de la gestion de la qualité recevait de façon unanime une appréciation positive par tous les répondants, avec cependant le souhait de disposer d'une norme propre à l'ACP.

### III. REFERENTIELS ET METHODOLOGIE

#### A. Analyse des documents de référence

Les documents de référence pour l'accréditation des laboratoires de biologie et d'ACP comportent la norme 15189 et des documents édités par le COFRAC.

La **Norme NF ISO 15189 : Laboratoire de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence** (1) est éditée et commercialisée en France par l'AFNOR.

Les autres documents sont édités par la section Santé Humaine (SH) du COFRAC et comprennent :

- des **documents de référence** (REF) qui sont des référentiels « opposables », c'est-à-dire que leur respect s'impose pour l'accréditation au même titre que la norme,
- des **documents d'information** (INF) qui donnent des informations le plus souvent sous forme de liste (par exemple : liste des organisateurs d'EEQ, liste des membres des instances de la section SH du COFRAC, liste des portées d'accréditations, etc.).
- des **guides techniques d'accréditation** (GTA) qui apportent des précisions ou des recommandations reconnues comme étant les plus appropriées par le COFRAC pour répondre aux exigences de la norme. Ces documents ne sont pas « opposables », c'est-à-dire que le laboratoire peut répondre d'une autre manière aux exigences de la norme à condition de le justifier,
- des **formulaire**s (FORM) qui peuvent être utilisés pour communiquer certains éléments au COFRAC.

Nous ne présenterons que les référentiels qui ont été utilisés pour ce travail de validation de méthode.

## **1. La Norme NF EN ISO 15189 : Laboratoire de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence (1)**

### **a) Exigences générales de la norme**

La première version de la norme a été publiée en 2003, puis elle a subi deux révisions, en 2007 et en 2012.

« NF » signifie qu'il s'agit d'une norme française éditée par l'AFNOR, « EN » indique qu'elle figure dans la liste des normes harmonisées de la Commission Européenne et « ISO » qu'elle fait partie des normes internationales établies par l'ISO.

La version 2012 met l'accent sur deux principes :

- l'approche processus, que nous développerons plus loin, qui permet d'améliorer en continu le fonctionnement du laboratoire,
- la gestion des risques, dont le but est d'anticiper tout incident et d'y répondre de manière adaptée en cas de survenance.

Elle se décline en cinq chapitres :

- Le premier chapitre concerne le « domaine d'application » de la norme.
- Le chapitre deux traite brièvement, en les citant, des autres références normatives auxquelles les laboratoires peuvent se référer.
- Le troisième chapitre est consacré aux termes et définitions.

Ce sont les chapitres quatre et cinq qui constituent l'essentiel de la norme :

- Le chapitre quatre fixe les exigences relatives au management du laboratoire. Il s'agit tout d'abord d'exigences générales sur la responsabilité et la mise en place d'une organisation et d'un système de management de la qualité, ainsi que la gestion et la maîtrise des documents. Puis sont abordées les relations du laboratoire avec l'extérieur concernant les contrats de prestation, la sous-traitance de certains examens, les relations avec les services externes et d'approvisionnements et les conditions de prestations de conseils. Enfin sont abordés les points concernant la gestion du système qualité notamment le traitement des réclamations, l'identification et la maîtrise des non-conformités, les

actions préventives et correctives, l'amélioration continue, les évaluations et audits et enfin la revue de direction.

- Le chapitre cinq concerne les exigences techniques. Sous ce terme se cache l'activité quotidienne du laboratoire qu'il faut formaliser et détailler dans des documents. Ces exigences techniques englobent non seulement l'activité du personnel (dont la compétence est à démontrer), mais aussi la fiabilité et la conformité du matériel, des équipements, des locaux et la gestion des consommables. La maîtrise des processus pré-analytiques, analytiques et post-analytiques doit être effective ainsi que la mise en place de contrôles de qualité internes et externes. Enfin sont abordés le compte rendu des résultats, leur diffusion et la gestion des informations de laboratoire.

#### **b) Exigences pour la vérification/validation des méthodes**

La vérification/validation des méthodes est abordée dans les chapitres 3, 5.3 et 5.5 :

- **§ 3.26 et 3.27 :**

« Vérification : confirmation, par des preuves tangibles, que les exigences spécifiées ont été satisfaites

Validation : confirmation, par des preuves objectives, que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites. »

- **§ 5.3.1.2 :**

« Le laboratoire doit vérifier, lors de l'installation et avant utilisation, que le matériel est capable d'atteindre les performances nécessaires et qu'il est conforme aux exigences relatives aux examens concernés. »

- **§ 5.5.1.2 :**

« Les procédures d'examen validées utilisées sans modification doivent faire l'objet d'une vérification indépendante par le laboratoire avant d'être utilisées régulièrement. La vérification doit confirmer, par des preuves tangibles, que les performances annoncées pour la procédure analytique ont été satisfaites. »



• § 5.5.1.3 :

« Le laboratoire doit valider les procédures analytiques déduites des sources suivantes :

- a) les méthodes non normalisées ;
- b) les méthodes conçues ou développées par le laboratoire ;
- c) les méthodes normalisées utilisées en dehors de leur domaine d'application prévu ;
- d) les méthodes validées, puis modifiées.

La validation doit être aussi étendue que nécessaire et confirmer, par des preuves tangibles (sous la forme de caractéristiques de performances), que les exigences spécifiques pour l'utilisation prévue de l'examen ont été satisfaites.

Le laboratoire doit documenter la procédure utilisée pour la validation et enregistrer les résultats obtenus. Le personnel compétent doit examiner les résultats de la validation et enregistrer la revue. Si des modifications sont apportées à une procédure analytique validée, l'influence de ces modifications doit être documentée et, le cas échéant, une nouvelle validation doit être réalisée.»

Ainsi, la norme distingue **deux situations** :

- lorsque le laboratoire utilise une **méthode normalisée** qu'il applique sans modification, il doit **vérifier** que les performances attendues de la méthode sont conformes à celles annoncées : il s'agit d'une **vérification de méthode** ;
- lorsque le laboratoire utilise une **méthode non normalisée, modifiée ou développée** par ses soins, il doit **valider** cette méthode pour prouver qu'elle répond bien aux exigences de l'utilisation prévue : il s'agit d'une **validation de méthode**.

Comme nous le verrons, cette distinction est essentielle car elle conditionne le type de portée d'accréditation demandée et les modalités pratiques de la réalisation d'un dossier de vérification/validation. Ces deux situations correspondent en effet à deux grands types de portées d'accréditation, qui sont définies dans 2 autres documents édités par le COFRAC : le *SH REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation* et le *SH INF 50 : Portées types d'accréditation* (16,17).

## 2. Définition des portées d'accréditation : SH REF 08 et SH INF 50

### a) Le SH REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation (16)

Ce référentiel définit et détaille les différents types de portées d'accréditation que le laboratoire peut demander.

Les portées sont dites « flexibles » car le laboratoire doit pouvoir faire évoluer les méthodes utilisées, contrairement à une portée « fixe » qui nécessiterait une approbation préalable du COFRAC avant toute modification.

Pour les laboratoires de biologie ou d'ACP il existe 2 types de portées d'accréditation :

- « **La portée flexible standard (A)**, correspond à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, d'utiliser sous accréditation les révisions successives de méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées. »
- « **La portée flexible étendue (B)**, correspond à une demande d'accréditation du laboratoire souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées.» (16)

Ainsi lorsque le laboratoire utilise une **méthode normalisée appliquée sans modification**, il doit **vérifier** que les performances attendues sont conformes et demande une accréditation en **portée flexible standard de type A**. Une fois accrédité, il pourra utiliser les révisions de cette méthode ou en adopter une autre à condition qu'elle soit elle aussi **normalisée**.

Alors que lorsque il utilise une **méthode non normalisée, modifiée ou développée** par ses soins, il doit alors **valider** cette méthode et demande une accréditation en **portée flexible étendue de type B**. Le laboratoire pourra alors mettre en œuvre de nouvelles méthodes **adaptées ou développées** par ses soins, à condition de **valider de nouveau chaque modification** pouvant avoir une influence sur la qualité.

## **b) Le SH INF 50 : Portées-types d'accréditation (17)**

Ce document détaille de façon précise chaque portée d'accréditation pour chaque examen ou analyse pouvant être accrédité.

Chaque portée est définie dans un tableau comportant :

- La nature de l'échantillon biologique,
- La nature de l'examen/analyse,
- Le principe de la méthode,
- Les références de la méthode : méthode reconnue (portée A) ou méthode adaptée ou développée (portée B).

Les différents examens et analyses sont classés en domaines et sous-familles. Par exemple le domaine Anatomie et Cytologie Pathologiques comporte 18 portées regroupées en 5 sous-familles (histologie, cytologie, virologie, génétique somatique et autopsie) (**Tableau 1**)

En France, parmi les 17 laboratoires d'ACP accrédités, 8 laboratoires sont accrédités pour une ou plusieurs portées d'histologie et 11 pour une ou plusieurs portées de cytologie. Les autres portées accréditées concernent la virologie et la génétique somatique. (14)

Sous Famille	Code de la portée	Nature de l'examen/analyse
HISTOLOGIE	HA1	Examen histologique – Colorations standards
	HA2	Examen extemporané
	HA3	Examen histologique – Colorations spéciales
	HA4	Immunohistochimie qualitative
	HA5	Immunohistochimie quantitative
	HA6	Immunofluorescence
	HA7	Hybridation moléculaire <i>in situ</i>
	HA8	Analyse d'expression génétique (transcrits d'ARN)
	HA 9	Examen histologique : microscopie électronique
CYTOLOGIE	CA1	Frottis cervico-utérin en milieu liquide
	CA 2	Cytologie en milieu liquide autre que le frottis cervico-utérin
	CA 3	Cytologie sur lame : frottis cervico-utérin, ponctions, apposition, etc.
	CA 4	Immunocytochimie qualitative sur cytologie en milieu liquide
	CA 5	Immunocytochimie quantitative sur cytologie en milieu liquide
	CA 6	Immunofluorescence sur cytologie en milieu liquide
VIROLOGIE	VA 1	Détection d'HPV potentiellement oncogène(s) sur frottis cervico-utérin en milieu liquide
GENETIQUE SOMATIQUE	GA 1	Recherche et caractérisation de mutations ponctuelles ou de réarrangements (génotypage)
AUTOPSIE	AA1	Autopsie à visée scientifique sur corps humain

**Tableau 1. Portées types d'accréditation du domaine Anatomie et Cytologie Pathologiques selon le SH INF 50 (17).** ARN : acide ribonucléique ; HPV : papillomavirus humain.

### **3. Guides techniques**

#### **a) Le SH GTA 03 : Guide technique d'accréditation en anatomie et cytologie pathologiques (18)**

Ce guide propose des recommandations résultant de l'application de la norme NF EN ISO 15189 en structure d'ACP. Il est entré en application le 1er Novembre 2014.

Il a été rédigé avec la participation de représentants de la profession dans l'optique de prendre en compte les spécificités de l'ACP et de faciliter leur démarche d'accréditation.

Il reprend, chapitre par chapitre, les exigences de la norme et précise, si besoin, leurs modalités d'application en ACP en fournissant des exemples pratiques adaptés.

Il insiste sur deux points particulièrement importants :

- d'une part : « en anatomie cytologie pathologiques, le contrôle visuel des résultats, sur chaque lame lors de son interprétation, constitue une "veille" continue de la qualité technique ». Ce point est une particularité importante de l'ACP ;
- et d'autre part que « l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 porte sur les modalités techniques et managériales de la structure d'anatomie et cytologie pathologiques permettant l'établissement du compte rendu diagnostique et non sur le diagnostic en tant que jugement professionnel médical. »

Ainsi, dans la démarche d'accréditation, le diagnostic anatomo-pathologique n'est pas évalué. L'évaluation de la compétence diagnostique relève en ACP des sociétés savantes et de l'AFAQAP : formation continue, participation à des EEQ, évaluations autour des réunions de concertation pluridisciplinaire et des réponses de second avis, autres types d'actions internes aux structures et listées dans l'annexe 5 des RBPACP (12).

La validation des méthodes est abordée dans le chapitre 5.5 :

- **§ 5.5.1.1 :**

« Le terme "procédures analytiques" de la norme correspond en ACP aux procédures techniques (ex : histologique, cytologique, moléculaire, ...).

En ACP, on distingue deux grands types de méthodes, les techniques morphologiques (type Histologie, Cytologie, IHC) et les techniques moléculaires "sur tubes" (type HPV).

Les techniques morphologiques ne disposent généralement pas de protocoles fournisseurs complets. En cas de protocoles fournisseurs incomplets, les techniques morphologiques font alors l'objet d'une validation de méthode. En cas de protocoles fournisseurs complets, elles font alors l'objet d'une vérification de méthode. [...]

La structure ACP doit au préalable, avant vérification ou validation de méthode, définir ses paramètres de performance. Cette caractérisation s'effectue sur la totalité des phases de l'examen. Chaque structure apprécie le nombre d'échantillons à traiter dans le cadre de cette vérification / validation. »

- **§ 5.5.1.3 : Validation des procédures analytiques**

« Cas de méthodes adaptées / développées en interne :

Dans ce cas, par exemple coloration HES, la structure ACP peut se baser sur des publications scientifiques pour déterminer ses paramètres de performance.

Les méthodes mises au point ou développées en interne, sur la base de publications scientifiques, et/ou adaptées des méthodes de référence, sont à valider de manière appropriée, pour démontrer qu'elles sont adaptées aux besoins de la structure ACP et de ses clients (cf. §7.3 du document COFRAC SH REF 08), en terme de performances analytiques. [...]

La validation des méthodes qualitatives s'appuie sur la gestion des risques (méthode des 5M), la qualification / habilitation des opérateurs, le suivi des contrôles de qualité (EEQ) et les confrontations internes cyto-morphologiques (exemple confrontation de cas entre cytotechniciens). »

## **b) Le SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes (19)**

Ce guide concerne spécifiquement la vérification/validation des méthodes.

Il indique les différents éléments que doit comporter le dossier de vérification/validation :

- **§ 7.1 :**

- « · Présentation du processus analytique (étape(s), méthode(s), éléments à vérifier/valider),
- Maîtrise des risques,
- Détermination des critères de performances (paramètres) à vérifier,
- Détermination des spécifications ou limites acceptables (objectifs à atteindre) de ces critères,
- Vérification bibliographique,
- Plan d'expérience et mise en œuvre expérimentale dans le laboratoire,
- Compilation et traitement statistique des données obtenues,
- Conclusion et décision quant à la validation opérationnelle de la technique, au regard des spécifications (limites acceptables) initialement fixées. [...]

Le formulaire présentant une synthèse de la vérification/validation sera demandé au laboratoire par le COFRAC pour établir l'expertise technique préalable à toute demande d'accréditation initiale, d'extension ou d'ajout. »

Le COFRAC met à disposition un formulaire (SH FORM) de vérification/validation des méthodes. Il n'est pas obligatoire de l'utiliser mais, si le laboratoire souhaite utiliser un autre document, il doit comporter à minima les points abordés dans ce formulaire.

A noter que, lors de l'élaboration du premier dossier de validation, au premier trimestre 2015, la version du guide technique en vigueur était celle d'avril 2011 (Révision 00). Le second dossier a été réalisé d'après la version suivante (Révision 01), d'avril 2015.

Les différences portent notamment sur :

- ❖ la distinction, dans la nouvelle version, des processus analytiques simples et complexes dans le § 5.1 :
  - « Les examens de biologie médicale peuvent être constitués d'une seule méthode/étape/processus (appelé "processus simple", comme le dosage des

protéines totales dans le sérum) ou de l'enchaînement de plusieurs méthodes/étapes/sous-processus, faisant appel à des méthodes quantitatives et/ou qualitatives (appelé "processus complexe", comme le cas de l'ECBU ou de la Numération Formule Sanguine). Le rôle du biologiste consistera à identifier la nature des processus (simple ou complexe), puis à vérifier / valider chacune des étapes identifiées. » ;

- ❖ l'apparition, dans la nouvelle version, de l'évaluation de la criticité des risques ;
- ❖ la modification du tableau des paramètres à vérifier (nous détaillerons ce point un peu plus loin) ;
- ❖ et la modification du formulaire de vérification/validation : avant la révision de 2015, il existait deux formulaires différents (SH FORM 43 pour les méthodes quantitatives et 44 pour les méthodes qualitatives). La révision ne laisse subsister qu'un seul formulaire, le SH FORM 43 révision 01, commun aux 2 types de méthodes.

## **B. La vérification/validation des méthodes doit s'intégrer dans la démarche globale d'amélioration continue du laboratoire : approche processus**

La vérification/validation des méthodes est le but ultime à atteindre pour un laboratoire qui souhaite être accrédité. C'est une étape majeure dans la démarche d'accréditation mais, si elle est nécessaire, elle est loin d'être suffisante. Elle doit impérativement s'intégrer au sein d'une démarche globale d'amélioration continue.

Cette démarche doit notamment s'appuyer sur une « approche processus » qui fait partie des exigences de la norme 15189.

En effet, un laboratoire de biologie ou d'ACP est, comme n'importe quel organisme, composé de nombreux processus liés les uns aux autres et qui doivent parfaitement fonctionner ensemble. Le laboratoire doit assurer l'intégration de tous les processus nécessaires pour répondre à la fois à sa fonction, à sa politique et ses objectifs qualité, ainsi qu'aux besoins et exigences des utilisateurs (patients et prescripteurs).



**Un processus** est défini comme un ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforment des éléments d'entrée en éléments de sortie, en leur apportant une valeur ajoutée.

On distingue habituellement :

- Les **processus « métiers »** qui sont l'activité de l'organisme à proprement parler,
- Les **processus « supports »** qui fournissent les ressources nécessaires à la réalisation de l'activité,
- Les **processus de « pilotage »** qui pilotent les orientations de l'organisme, son management et sa démarche qualité.

L'approche processus est une analyse systémique destinée à maîtriser et améliorer en continu le fonctionnement du laboratoire. Pour cela il doit :

- identifier et décrire les différents processus et la façon dont ils s'articulent les uns avec les autres afin d'avoir une vision globale de son organisation,
- déterminer les critères et les méthodes pour assurer l'efficacité du fonctionnement et la maîtrise des processus,
- assurer la disponibilité des ressources et informations nécessaires au fonctionnement et à la surveillance des processus,
- surveiller et évaluer les processus et mettre en œuvre les actions nécessaires pour obtenir les résultats prévus et améliorer de façon continue les performances.

En ACP, les **processus « métiers »**, regroupent les activités à proprement parler du laboratoire : examen histologique, cytologique, immunohistochimique, etc. Ces activités sont elles-mêmes décomposées en 3 processus : pré-analytique, analytique et post-analytique.

- ❖ Classiquement, le **processus pré-analytique** couvre tous les aspects depuis la prescription des examens par le clinicien, jusqu'à la mise en œuvre de la technique d'analyse. Il comprend en général la demande d'examen, la préparation et l'identification du patient, le prélèvement de l'échantillon, son acheminement jusqu'au laboratoire et au sein du laboratoire.
- ❖ Le **processus analytique** est l'analyse en elle-même.
- ❖ Le **processus post-analytique** comprend les étapes suivantes et comporte habituellement l'interprétation diagnostique, la mise en forme et la validation d'un

compte rendu, la conservation et le stockage du matériau d'analyse, la mise au rebus des échantillons et la conservation des résultats d'examens.

Ce découpage n'offre qu'un cadre de travail sur le processus technique global d'ACP. Le « bornage » précis de ces 3 processus est laissé au libre choix du laboratoire.

Les **processus** « **supports** » comprennent la gestion du personnel, du système informatique, des équipements, des achats et des stocks, etc.

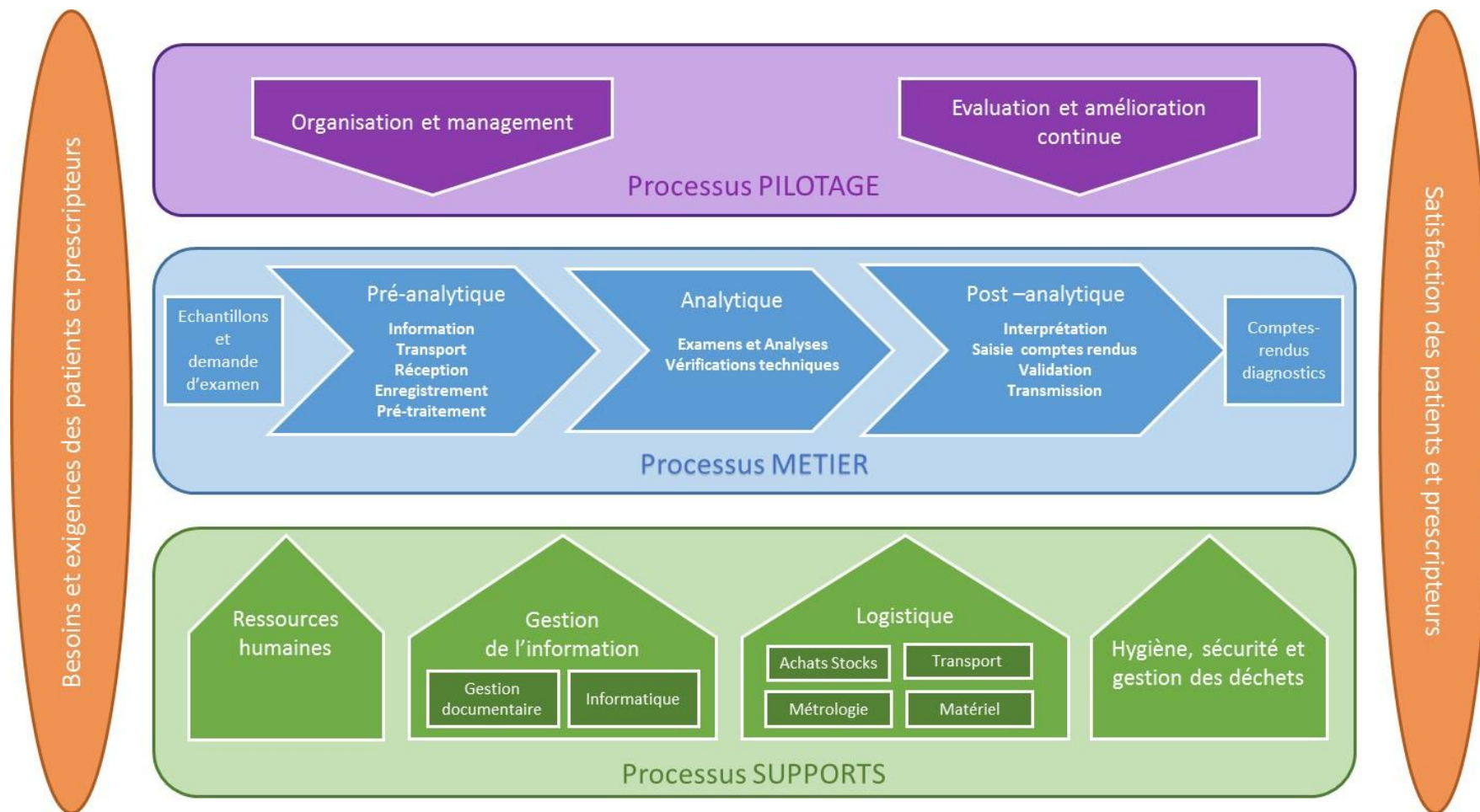
Enfin, les **processus** « **pilotes** » comprennent l'organisation, le management et la démarche qualité de la structure.

Un exemple de cartographie générale des processus pour un laboratoire d'ACP est présenté dans la **figure 3** à la page suivante.

La vérification/validation des méthodes est donc l'aboutissement d'une démarche beaucoup plus globale qui vise à maîtriser l'ensemble des processus du laboratoire.

Une vérification/validation doit prendre place dans un système de management de la qualité bien établi au sein de la structure. Notamment, les différents processus doivent être identifiés, définis, documentés et maîtrisés.

La démarche de vérification/validation doit elle-même répondre à une « procédure générale de vérification/validation des méthodes » rédigée par le laboratoire. Il doit également rédiger une procédure de « gestion de la portée flexible » qui précise la démarche qu'il adoptera si un changement intervient sur une méthode accréditée.



**Figure 3.** Exemple de cartographie générale des processus pour un laboratoire d'ACP

## **C. Méthodologie pratique de la validation des méthodes en ACP**

Comme nous l'avons vu, la demande d'accréditation du laboratoire se fait pour une ou plusieurs portée(s). Dans les laboratoires d'ACP, il est rare qu'une méthode normalisée soit utilisée strictement sans aucune modification. Dans la majorité des cas, les méthodes utilisées sont des méthodes fournisseurs adaptées voir des méthodes totalement développées par le laboratoire. Ainsi, l'accréditation en ACP relève le plus souvent d'une **validation de méthode** selon une **portée flexible étendue de type B**. C'est notamment le cas des méthodes que nous avons choisies et nous nous limiterons donc volontairement à ce cas de figure dans la suite de cette thèse.

La validation des méthodes est un travail long et complexe qu'il est nécessaire de décomposer en plusieurs étapes. Ces étapes ne sont pas forcément successives, certaines peuvent se dérouler en parallèle. Le laboratoire peut même choisir d'effectuer certaines étapes dans un ordre différent. Nous les avons listées et détaillées dans l'ordre qui nous est apparu le plus logique.

### **1. Choisir la méthode à valider et faire un état des lieux**

Le laboratoire doit choisir la méthode qu'il souhaite valider. La plupart des laboratoires d'ACP choisissent de débuter par une méthode qualitative car le nombre de paramètres à vérifier est plus limité et l'analyse des résultats plus simple.

L'état des lieux doit permettre de faire une « photographie instantanée » des modalités de mise en œuvre de la méthode dans le laboratoire, des ressources documentaires existantes, des contrôles qualité déjà mis en place, etc.

### **2. Mettre au point la technique, si nécessaire**

Si le dossier de validation est fait à l'occasion de l'adoption d'une nouvelle méthode ou d'une modification d'une méthode déjà employée, une étape de mise au point technique doit être réalisée. Les modalités doivent être adaptées en fonction de la technique et des modifications envisagées.

Si la méthode est déjà employée en routine au laboratoire et ne nécessite pas de modification alors cette étape ne sera pas réalisée.

### 3. Planifier le déroulement de la validation

Les étapes sont nombreuses et il convient donc de bien les planifier. La validation d'une méthode nécessite l'implication des personnes qui mettent en œuvre la méthode au quotidien. Un groupe de travail doit être constitué et être représentatif de l'ensemble des personnels concernés par l'utilisation de la méthode. Il est indispensable que certains membres du groupe de travail soient formés à la validation des méthodes.

Il faut déterminer sur quelle période se fera la validation, qui en sera responsable et fixer des échéances et des responsabilités pour chacune des étapes, en veillant à ce qu'elles s'articulent correctement les unes avec les autres.

Ces données devront figurer dans la partie « mise en œuvre » du dossier de validation.

### 4. Déterminer les caractéristiques de la méthode pour définir le cadre de la validation et décrire précisément la méthode

Les caractéristiques de la méthode vont conditionner le type de portée demandée et les paramètres à étudier. Elles doivent donc être précisément déterminées.

❖ La méthode est-elle **quantitative** ou **qualitative** ?

Les **méthodes quantitatives** fournissent un résultat chiffré, sur une échelle continue à partir de la mesure d'un signal en relation directe avec une quantité (analyte, molécule, cellule, organisme,...) ou une activité donnée de l'analyte.

Les **méthodes qualitatives** n'apportent pas d'information sur la quantité de l'analyte, cellule ou organisme, mais seulement sur sa présence ou son absence, ou l'identification d'une caractéristique.

❖ Le type de portée : est-ce une méthode **normalisée** ou une méthode **adaptée ou développée** par le laboratoire ?

❖ Le processus est-il **simple** ou **complexe** ? Comment s'intègre-t-il dans les activités du laboratoire ? Où commence et finit le processus analytique ?

❖ Quelle est le principe de cette méthode, sa finalité et son domaine d'application ?

Dans le dossier de validation, il faudra décrire la méthode choisie de façon très précise : le ou les analyte(s), le type d'échantillon primaire, le type de récipient, les équipements et réactifs utilisés, l'unité de mesure, les critères d'interprétation, les différentes étapes du pré-traitement de l'échantillon et de la méthode analytique, et le matériau d'étalonnage ou matériau de référence utilisé.

## **5. Effectuer des recherches bibliographiques**

Il s'agit d'étudier la documentation fournisseur et les données disponibles de la littérature concernant la méthode à valider. Ces recherches fournissent en général des indications pertinentes sur la méthode en elle-même et sur l'existence de recommandations disponibles pour l'évaluer.

Les préconisations, recommandations ou publications concernant les conditions pré-analytiques pourront notamment aider à déterminer les éléments critiques du processus pré-analytique lors de l'étape de l'analyse de risques.

Cette étape doit normalement servir à déterminer les valeurs de référence, les critères attendus de performance de la méthode et les limites acceptables afin de fixer les objectifs analytiques mais, en pratique, ces données sont rarement disponibles en ACP et le laboratoire devra souvent les fixer lui-même.

## **6. Déterminer les performances attendues, les limites d'acceptabilité et les objectifs analytiques**

L'objectif de la validation est de déclarer l'aptitude du processus analytique par rapport aux performances attendues, en fixant une limite d'acceptabilité. Ces éléments doivent être fixés ***a priori***.

Le laboratoire se donne ainsi des objectifs analytiques à atteindre. Ce choix peut s'appuyer sur les données des fournisseurs, des recommandations de sociétés savantes ou en fonction de « l'état de l'art » (représentant les performances analytiques obtenues, à un moment donné, dans un certain nombre de laboratoires).

En ACP, les recommandations des sociétés savantes indiquent souvent des recommandations générales de bonnes pratiques mais ne comportent pas réellement d'indications concernant les performances des méthodes. Il n'existe pas non plus, en général, de publications de limites acceptables basées sur « l'état de l'art ».

Il appartient donc au laboratoire de fixer lui-même ces éléments a priori, en tenant compte des caractéristiques de la méthode, de ses besoins et de son utilisation prévue, puis de juger si la méthode répond bien aux exigences qu'il s'est lui-même fixées.

## **7. Choisir l'étalon ou matériau de référence**

Un matériau de référence est un « matériau ou substance dont certaines propriétés sont suffisamment homogènes et bien définies pour permettre de les utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage ou l'attribution de valeurs aux matériaux. » (20)

Un matériau de référence certifié est en plus « accompagné d'un certificat dont les propriétés sont certifiées par une procédure validée avec incertitude à un niveau de confiance connu. »

En ACP ce genre de matériau n'est pas commercialisé et le laboratoire doit donc mettre au point ou déterminer lui-même son matériau de référence.

Il peut, par exemple, s'agir d'échantillons utilisés lors de la participation à une EEQ et ayant reçu une bonne évaluation, d'échantillons précédemment analysés utilisés comme témoins positifs ou négatifs, d'échange d'échantillons avec d'autres laboratoires, d'échantillons sélectionnés par le laboratoire comme étant d'excellente qualité et représentant le « gold standard » à atteindre, etc.

## **8. Faire une analyse de risques et des modalités de maîtrise**

L'analyse de risques (ou grandeurs d'influence) et des modalités de maîtrise sont des éléments obligatoires à fournir dans le dossier de validation. Le but est d'identifier tous les facteurs qui peuvent **ou pourraient** influencer la qualité du résultat obtenu : il s'agit des « points critiques » qui doivent être maîtrisés pour assurer une bonne qualité.

Le guide technique de vérification/validation des méthodes (SH GTA 04 (19)) indique que les risques peuvent être identifiés à partir de l'étude des non-conformités et des réclamations et/ou à partir de l'étude minutieuse des processus pour mettre en évidence les étapes sensibles lors de leur réalisation. La méthode des 5M (Matériel, Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matériel) est recommandée.

Dans le nouveau SH FORM 43, le laboratoire doit également évaluer la « criticité » de chaque risque afin de hiérarchiser les actions de maîtrise à mettre en place. Evaluer la criticité consiste à quantifier un risque. Habituellement, la criticité est déterminée à partir de la fréquence, de la gravité et de la détectabilité de chaque risque.

Il convient ensuite de déterminer comment le laboratoire maîtrise chacun de ces risques ou comment il pourrait le faire.

Il ne faut pas oublier dans l'analyse de faire une évaluation métrologique (évaluation concernant les mesures). Si des mesures (masse, volume, longueur, temps) peuvent avoir une influence sur la qualité du résultat, il faudra alors vérifier les instruments utilisés et/ou les étalonner régulièrement. De même, si la température doit être maîtrisée (pour la conservation des échantillons et réactifs par exemple) il faudra alors procéder à des contrôles adaptés. Le *Guide technique d'accréditation en ACP* (SH GTA 03 (18)) apporte une aide précieuse pour la gestion de la métrologie en laboratoire d'ACP, avec de nombreuses indications et des exemples pratiques.

## **9. Vérifier et actualiser les documents concernés**

L'étape précédente est souvent l'occasion de faire une revue des documents du laboratoire et de les actualiser, notamment en y insérant les nouvelles modalités de maîtrise identifiées à l'étape précédente.

## **10. Déterminer les paramètres à vérifier et mettre au point le plan expérimental**

En fonction du type de méthode, le guide technique de vérification/validation des méthodes (SH GTA 04) recommande d'étudier différents paramètres.



Lors de la réalisation du premier dossier de validation, le *SH GTA 04 – Révision 00* recommandait d'évaluer les performances suivantes pour la vérification/validation :

- Des méthodes qualitatives :

PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE	Bibliographie	Vérification sur site Portée de type A	Validation Portée de type B
<b>Spécificité analytique</b>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<b>Sensibilité diagnostique</b>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<b>Stabilité des réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<b>Robustesse</b>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
Comparaison avec méthode de référence	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui (si existe)</i>
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire <sup>11</sup>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Oui (si possible)</i>	<i>Oui</i>
<b>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>12</sup> de la méthode ou du système analytique.</b>			

**Tableau 2. Paramètres à vérifier pour les méthodes qualitatives.** Copie issue du *SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes – Révision 00*

- Des méthodes quantitatives :

<b>PARAMETRES A VERIFIER ET/OU A CONNAITRE</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>Vérification sur site Portée de type A</b>	<b>Validation Portée de type B</b>
<i>Spécificité analytique</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<i>Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<i>Justesse (approche de la)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui, dès que possible</i>	<i>Oui</i>
<i>Intervalle de mesure (Limite de quantification et limites de linéarité)</i>	<i>Oui</i>	<i>A vérifier si nécessaire<sup>4</sup></i>	<i>Oui</i>
<i>Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<i>Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui, pour les paramètres sensibles</i>	<i>Oui</i>
<i>Stabilité réactifs (après ouverture, embarqués)</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Oui</i>
<b>Robustesse</b>	<i>Non</i>	<i>Non</i>	<i>si besoin</i>
<i>Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments)</i>	<i>Oui</i>	<i>à vérifier si nécessaire<sup>5</sup></i>	<i>Oui</i>
<i>Intervalle de référence « ex-valeurs normales »</i>	<i>Oui</i>	<i>à vérifier dès que possible, si justifié</i>	<i>Oui à établir</i>
<i>Comparaison avec une méthode de référence</i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Non</i>	<i>Oui (si possible)</i>
<i>Comparaison avec méthode déjà utilisée au LBM ou autre méthode du LBM (appareil en miroir, EBMD)<sup>6</sup></i>	<i>Oui (si existe)</i>	<i>Oui (si possible)</i>	<i>Oui</i>
<i>Analyse des discordances<sup>7</sup></i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>	<i>Oui</i>
<b>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>8</sup> de la méthode ou du système analytique.</b>			

**Tableau 3. Paramètres à vérifier pour les méthodes quantitatives.** Copie issue du SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes – Révision 00

La nouvelle version, SH GTA 04 – Révision 01, comporte un tableau plus complexe mêlant méthodes qualitatives et quantitatives, qu'il est plus difficile d'appréhender :

CRITERES A EVALUER	Vérification (portée A)		Validation (portée B)	
	Méthode quantitative	Méthode qualitative	Méthode quantitative	Méthode qualitative
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Justesse/exactitude</b> (approche)	Essai	Essai	Essai	Essai
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité	Essai	Maîtrise des facteurs de variabilité
<b>Comparaison</b> avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir <sup>9</sup> , EBMD) et analyse des discordances <sup>10</sup>	Essai	Essai	Essai	Essai
Intervalle de mesure ( <b>Limite de quantification et limites de linéarité</b> )	Bibliographie		Essai	/
<b>Interférences</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Robustesse</b>	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Bibliographie	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Intervalle de référence</b> (valeurs usuelles)	Bibliographie (fournisseur ou autre, s'assurer de la cohérence avec l'état de l'art)	Bibliographie	Essai	Essai
<b>Limite de détection</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Spécificité/sensibilité analytique</b>	/	Bibliographie	/	Essai
<b>Le dossier doit conclure sur l'avis d'aptitude<sup>11</sup> de la méthode ou du système analytique.</b>				

**Tableau 4. Paramètres à vérifier pour les méthodes qualitatives et quantitatives.**  
Copie issue du SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes – Révision 01

Le guide technique donne des définitions et des exemples pour chaque paramètre, ainsi que des méthodes de calcul pour les méthodes quantitatives. Les différents paramètres seront définis plus précisément dans les plans expérimentaux des dossiers réalisés.

La mise au point du plan expérimental doit permettre de répondre aux critères de performance à vérifier. Le laboratoire choisit les tests à effectuer pour évaluer au mieux chaque critère et détermine sur quels échantillons ils vont être réalisés. Si un paramètre ne peut pas être évalué le laboratoire devra le justifier.

### **11. Réaliser les expériences**

Le laboratoire doit sélectionner les échantillons sur lesquels vont porter les expériences. En ACP, comme nous l'avons vu, il n'existe souvent pas d'étalon ou de matériau de référence utilisable et c'est donc au laboratoire de choisir sur quels échantillons les tests vont être effectués.

Les expériences doivent être réalisées conformément au plan expérimental fixé *a priori*. Les preuves de leur réalisation doivent être archivées avec le dossier de validation et pourront être examinées par l'évaluateur lors de la visite d'accréditation.

### **12. Analyser les résultats**

Tous les résultats obtenus à l'étape précédente doivent être analysés pour vérifier la conformité de la méthode par rapport aux exigences préalablement établies pour chaque paramètre. On doit retrouver dans le dossier de validation, pour chaque critère de performance évalué, sa conformité (ou sa non-conformité) par rapport aux objectifs fixés.

Les discordances avec les performances attendues doivent toujours être investiguées.

### **13. Conclure et rédiger le dossier**

L'ensemble des éléments récoltés au cours du travail de validation doit être synthétisé dans un « dossier de validation » qui peut utiliser le formulaire proposé par le COFRAC.

Il faut conclure en fin de dossier sur l'aptitude de la méthode. Tous les éléments de preuve doivent être archivés pendant toute la durée d'utilisation et conservés 18 mois après l'arrêt d'utilisation de la méthode.

Concernant notre travail, il a été décidé aussi bien à l'IPC qu'à la Timone de présenter les dossiers de validation selon les formulaires proposés par le Cofrac.

#### **14. Prévoir le suivi de la méthode**

La vérification/validation des méthodes comprend une phase de validation initiale que nous venons de voir, puis une phase de vérification continue qui permet de confirmer les performances et de contrôler la qualité du processus analytique lors du fonctionnement en routine.

Ce contrôle repose, entre autre, sur la réalisation de contrôles internes de qualité (CIQ) et de comparaisons inter-laboratoires (par exemple via les EEQ proposées par l'AFAQAP ou des comparaisons inter-laboratoires organisées par les laboratoires eux-mêmes).

Concernant les CIQ, le *Guide technique d'accréditation en ACP* fournit des indications importantes dans le paragraphe 5.6.2 :

« La structure ACP met en œuvre des contrôles qualité adaptés couvrant le processus analytique pour démontrer sa maîtrise. Il appartient à la structure ACP de définir les modalités de ces contrôles. Plusieurs modalités sont à envisager en fonction de la nature de l'examen. A titre d'exemple :

Cas des techniques morphologiques

- Pour les techniques de routine (exemple coloration HE/HES), une évaluation de la qualité des coupes, des résultats attendus de la coloration, de l'épaisseur de la coupe, est effectuée en continu sur chaque lame. Il en est de même pour les techniques immunohistochimiques avec témoins internes (ex : marquage des mastocytes avec anticorps anti-CD 117).
- Pour les techniques IHC (immunohistochimie) nécessitant une évaluation de l'intensité du signal, des témoins externes calibrés sont nécessaires.

- Cytologie de dépistage : lorsqu'elle repose sur une lecture réalisée par les cytotechniciens, il appartient à la structure ACP d'évaluer régulièrement l'habilitation du personnel réalisant cette tâche et de mettre en place des contrôles qualité adaptés.
- Dans le cas de méthodes IHC et HIS (hybridation in situ) dont les résultats sont exprimés sous forme de score au moins un matériau de contrôle est à choisir dans la zone de seuil de décision clinique (ex : HER2, RO-RP, ...). »

Le laboratoire doit aussi définir un ou des indicateur(s) qualité pour surveiller les processus analytiques. Ce ou ces indicateur(s) doit(vent) être pertinent(s) pour évaluer la qualité d'une méthode, être surveillé(s) et périodiquement revu(s). Il peut s'agir par exemple du nombre de non-conformités analytiques, du nombre d'analyses refaites, du délai de rendu des résultats, etc.

#### **IV. MISE EN PRATIQUE : la validation appliquée à la coloration standard en histologie à l'Institut Paoli-Calmettes**

##### **A. Présentation de la structure et du système institutionnel de la qualité**

###### **1. L'Institut Paoli-Calmettes**

L'IPC est un Centre de lutte contre le cancer (CLCC) situé à Marseille. Il est qualifié d'Etablissement de santé privé d'intérêt collectif par le *Code de la santé publique* et est chargé d'une mission de service public hospitalier en cancérologie.

L'établissement comptait 1580 salariés au 31 décembre 2015 et comportait 231 lits d'hospitalisation, 63 places en hôpital de jour, 20 places d'hospitalisation à domicile et 12 blocs opératoires. 10085 nouveaux patients ont été pris en charge en 2015.

###### **2. Le service d'anatomie et cytologie pathologiques**

Le service d'ACP fait partie du secteur de Biopathologie du Département de Biologie du Cancer (DBC). Ce secteur comprend également les plateaux techniques d'hématologie cellulaire et de cytogénétique. Par ailleurs, le DBC comprend trois autres secteurs : la biothèque, la thérapie cellulaire et l'oncogénétique moléculaire (**Annexe 1**).

Lors de la réalisation de ce travail en 2015, le service était composé de 7 médecins pathologistes (2 PU-PH, 3 PH temps plein, un AHU et un assistant des CLCC), de 12 techniciens de laboratoire, 6 aides laboratoire, 6 secrétaires, une technicienne principale, une cadre médico-technique et une cadre supérieure des laboratoires. Le service accueille 3 à 4 internes en médecine par semestre.

Les activités principales du laboratoire sont la sénologie, la gynécologie, l'hématologie et la pathologie digestive. Il existe également une activité d'urologie, de pathologie des tissus mous et de dermato-pathologie.

### **3. Le système institutionnel de la qualité**

Le DBC a initié sa démarche d'accréditation en 2011. Il s'agit d'une démarche institutionnelle soutenue par la direction générale et coordonnée par un comité de pilotage qui se réunit de façon périodique.

Un site intranet a été configuré pour assurer la gestion documentaire, la traçabilité des comptes rendus de réunions et la mise en commun des documents de travail. Le système de la qualité s'appuie également sur un logiciel de gestion de la qualité et des risques (Blue Medi Santé).

Le secteur d'ACP est accrédité depuis 2014 pour la technique d'immunohistochimie qualitative CD117. La réalisation de ce dossier de validation s'inscrivait dans une demande d'extension d'accréditation.

## **B. Histoire et principes de l'histologie humaine**

### **1. Histoire**

Bien que le terme « histologie » (étymologiquement, science des tissus, du grec *histos* : « tissu », et *logos* : « science ») n'ait été créé qu'en 1821 par Karl Friedrich Heusinger, pathologiste allemand, on considère que c'est l'italien Marcello Malpighi qui est le fondateur de l'histologie, au XVII<sup>e</sup> siècle. Son nom reste d'ailleurs attaché à plusieurs structures biologiques dont il a donné les premières descriptions.

La première description d'une cellule biologique a été faite par Robert Hook en 1665 à partir de l'observation de végétaux. La notion de « tissu » est, quant à elle, attribuée à Xavier Bichat qui, en 1799, introduit cette notion dans son ouvrage intitulé *Traité des membranes en général et de diverses membranes en particulier* (21).

L'histologie, en tant que science, s'est réellement constituée au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, à partir de la conjonction de l'avènement de la théorie cellulaire et du perfectionnement d'un instrument d'optique vieux d'environ deux siècles, le microscope optique.

Theodor Schwann dans son ouvrage *Recherches microscopiques sur la conformité de structure et de croissance des animaux et des plantes* (22) montre en effet que la cellule



est la structure élémentaire de tous les organes vivants, animaux ou végétaux, simples ou complexes.

De façon concomitante, le microscope est perfectionné et l'optique bénéficie de grandes améliorations. Des lentilles beaucoup plus performantes sont fabriquées, ce qui permet d'obtenir des images beaucoup plus proches de la réalité. C'est à cette époque que les techniques histologiques que nous connaissons aujourd'hui se mettent en place.

## **2. Principes de l'histologie moderne**

L'observation d'un tissu biologique avec un microscope optique nécessite des traitements particuliers des échantillons. En effet, l'observation avec un microscope optique suppose l'utilisation d'échantillons très fins puisque la lumière doit pouvoir les traverser pour qu'une image se forme.

La réalisation de préparations microscopiques à partir d'un prélèvement tissulaire nécessite ainsi une fixation préalable des tissus, de façon à « figer » les structures et éviter leur dégradation, puis leur imprégnation par un milieu solide pour pouvoir y réaliser des coupes minces. Ces coupes sont ensuite colorées puis recouvertes d'une lamelle pour assurer leur protection.

Fixation : en ACP, le fixateur le plus utilisé est le formol (formaldéhyde). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements.

Imprégnation : le milieu d'imprégnation classique est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation. Cette déshydratation se fait par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis l'alcool est ensuite remplacé par un solvant miscible à la paraffine (toluène, xylène ou substituts). Le prélèvement est ensuite coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue. Après refroidissement, on obtient un « bloc » qui peut être débité avec un microtome en coupes de quelques micromètres d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre. La préparation obtenue est appelée « lame blanche ».

Coloration : les colorations réalisées sur les coupes permettent de reconnaître les différents éléments de la préparation. La plupart des colorants sont des composants acides ou basiques en milieu aqueux qui forment des sels avec les radicaux ionisés des

tissus. Ainsi, les colorants acides colorent les zones tissulaires basophiles, et les colorants basiques, les zones tissulaires acidophiles.

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage (dans des bains de xylène, toluène ou substitut), en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant cette fois.

En ACP la coloration de « routine » dite « standard » utilise 2 ou 3 colorants : hématoxyline et éosine (HE), hématoxyline, éosine et safran (HES) ou hématoxyline, phloxine et safran (HPS).

De nombreuses colorations « spéciales » appelées aussi « signalétiques » permettent de visualiser différentes structures ou composants des tissus (par exemple, les fibres de réticuline par des colorations argentiques ou les fibres élastiques par l'orcéine).

Assemblage : les coupes colorées sont assemblées avec une lamelle pour les préserver. On dispose alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant), prête à être observée au microscope.

## **C. Réalisation de la validation**

Nous suivrons pour cette partie les étapes décrites dans la partie méthodologie.

### **1. Choix de la méthode et état des lieux**

La coloration standard a été choisie car elle est à la base du diagnostic anatomo-pathologique. Elle permet en effet de reconnaître les différents tissus, les types cellulaires, d'analyser leur morphologie et d'observer les anomalies éventuelles, les proliférations anormales, de les interpréter, de les classer en fonction des référentiels connus et des données accumulées dans la littérature scientifique et médicale et ainsi d'établir un diagnostic histopathologique pour la prise en charge des patients.

Elle représente, de fait, la plus grande part d'activité d'un laboratoire d'ACP. Démontrer la qualité de la technique et la compétence du laboratoire dans la mise en œuvre de cette méthode nous paraissait incontournable.

Dans le laboratoire, la coloration standard était réalisée avec deux automates de coloration de marques différentes : un automate Autostainer Jung XL de LEICA et un automate Coverstainer de DAKO. Deux dossiers de validation séparés ont donc dû être réalisés. Dans la suite, nous nous limiterons volontairement au dossier de validation de l'automate Autostainer Jung XL.

Un CIQ était déjà réalisé quotidiennement depuis mai 2013 : il s'agit d'une lame issue d'un prélèvement de tissu digestif sain qui est colorée chaque jour en début de matinée, avant la coloration des lames de routine. Une fois colorée et montée, la lame doit être validée par un pathologiste habilité avant de pouvoir colorer les lames de routine. En revanche, il n'y avait pas d'évaluation précise de la qualité selon des critères définis ni de limite d'acceptabilité fixée.

Le laboratoire participait également depuis 2014 à l'EEQ organisée par l'AFAQAP pour la coloration HE/HES.

Le service d'ACP étant déjà engagé dans une démarche d'accréditation, le socle du système de management de la qualité existait au début de ce travail et de nombreux documents étaient rédigés, diffusés dans le système documentaire institutionnel et appliqués. Les ressources documentaires existantes concernant le système de management de la qualité et le processus analytique de la coloration standard ainsi que les étapes nécessaires au prétraitement de l'échantillon comprenaient notamment :

➤ **Ressources générales et système management de la qualité**

- Un manuel qualité du DBC,
- Un manuel de prélèvement et référentiel des analyses de biologie du cancer,
- Une procédure prise en charge des demandes d'examens par le DBC,
- Un organigramme du DBC,
- Une procédure responsabilités et autorités en Biopathologie.

➤ **Ressources humaines**

- Une procédure recrutement et intégration du personnel à l'IPC,
- Une procédure expression des besoins de formation des salariés,
- Deux modes opératoires gestion du personnel médical et du personnel médico-technique au sein du DBC,

- Des fiches d'habilitation pour les médecins pathologistes, les techniciens et les aides laboratoire,
- Une fiche d'habilitation système qualité et gestion des risques.

➤ **Gestion documentaire**

- Une procédure maîtrise documentaire interne et maîtrise documentaire externe,
- Une procédure maîtrise des enregistrements : pour les activités en démarche qualité et/ou accréditées, les enregistrements du système de management de la qualité et les enregistrements techniques sont répertoriés dans une « matrice des enregistrements ». Ce tableau décrit les modes d'identification, d'indexation, de classement, d'archivage et d'élimination des enregistrements.

➤ **Documents associés à la validation des méthodes, à la gestion de la portée flexible et aux contrôles de qualité**

- Une procédure de vérification et validation de méthode,
- Une procédure de vérification-validation de méthode qualitative,
- Une procédure de gestion de la portée flexible mixte (A et B),
- Une procédure d'interprétation et d'exploitation des résultats des CIQ et EEQ.

➤ **Non-conformités et évènements indésirables**

- Une procédure modalités de signalement et gestion d'un évènement indésirable,
- Une procédure actions préventives ou correctives et amélioration continue,
- Un mode opératoire identification et maîtrise des non-conformités au sein du DBC.

➤ **Concernant les différentes étapes de la prise en charge d'un prélèvement d'histologie**

○ Transport des prélèvements au sein de l'institut

- Un mode opératoire circuits des pièces opératoires du bloc au laboratoire,
- Un mode opératoire circuits des prélèvements en imagerie médicale.

○ Enregistrement et macroscopie

- Une fiche d'instruction d'enregistrement informatique en Biopathologie,
- Un formulaire d'enregistrement de la réception des examens extemporanés,
- Un mode opératoire biopsie extemporanée,
- Deux modes opératoires (macroscopie pièces fraîches et macroscopie pièces fixées) et des fiches de macroscopie.

- Gestion des automates
  - Une procédure gestion des équipements critiques et non critiques,
  - Une procédure gestion des maintenances curatives des matériels biomédicaux.
- Stock et gestion des réactifs
  - Un mode opératoire maîtrise des achats et des stocks pour le département de biologie du cancer,
  - Une procédure gestion des alertes descendantes et ascendantes concernant les vigilances sanitaires règlementaires.
- Déshydratation, coupe et coloration
  - Un mode opératoire utilisation et entretien des automates à déshydratation,
  - Un mode opératoire enrobage et coupe des blocs de paraffine,
  - Un mode opératoire utilisation et entretien du colorateur Autostainer Jung XL,
  - Un mode opératoire technique de coloration HES et rendu des lames.

#### ➤ **Métrologie**

Concernant la métrologie, une cellule spécifique comprend 2 personnes formées à la métrologie et assistées par un prestataire de service externe. Cette cellule fait partie des processus supports et dispose d'un espace dédié sur le site intranet.

## **2. Mise au point de la technique**

La technique était déjà au point et aucune modification n'a été apportée.

## **3. Planification du déroulement de la validation**

Un groupe de travail a été constitué comprenant un médecin pathologiste, la technicienne principale, 2 techniciennes de laboratoire et moi-même. Le premier temps du travail a été une réflexion sur les différentes actions à accomplir et les délais de réalisation. Nous avons prévu de mener ce travail de Décembre 2014 à Mars 2015.

**(Tableau 5)**

<b>Action</b>	<b>Responsable(s)</b>	<b>Délai</b>
Détermination des caractéristiques de la méthode	Médecin/Interne	Décembre 2014
Description de la méthode	Médecin/Interne	Décembre 2014
Recherches bibliographiques	Interne	Décembre 2014
Détermination des performances attendues, des limites d'acceptabilité et des objectifs analytiques	Médecin/Interne	Décembre 2014
Choix du matériel de référence	Sélection : médecin/interne. Approbation : collégiale	Janvier 2015
Analyse des risques et des modalités de maîtrise	Groupe de travail au complet	Janvier 2015
Evaluation des exigences métrologiques	Cellule métrologie	Janvier 2015
Vérification/Actualisation des documents concernés. Rédaction de nouveaux documents si nécessaire.	Médecin / Interne /Technicienne principale	Janvier 2015
Mise au point du plan expérimental	Médecin/Interne	Février 2015
Sélection des échantillons	Interne	Février 2015
Réalisation des expériences	Techniciennes/ Technicienne principale	Mars 2015
Evaluation des lames test	3 pathologistes	Mars 2015
Analyse des résultats	Médecin/Interne	Mars 2015
Conclusion et rédaction du dossier	Médecin/Interne	Mars 2015

**Tableau 5. Planification de la validation de la coloration standard histologique à l'Institut Paoli-Calmettes**

#### 4. Détermination des caractéristiques et description de la méthode

Dans le service, la « frontière » entre la phase pré-analytique et la phase analytique a été fixée après l'obtention de la lame « blanche ». La phase analytique ne comprend que la phase de coloration standard qui est automatisée. Toutes les étapes au-delà font partie de la phase post-analytique.

Deux automates différents sont utilisés. Comme indiqué, nous ne traiterons que de la validation de l'automate Autostainer Jung XL de LEICA mis en service en 2005 qui réalise une coloration HPS.

La coloration HPS utilise 3 colorants :

- **L'hématoxyline** sert à marquer les noyaux cellulaires en bleu/noir. Elle a été introduite par F. Böhmer en 1865. Elle provient d'un arbre tropical, le Campêche (*Haematoxylum campechianum*), que l'on trouve en Amérique centrale et aux Antilles. Le principe colorant, l'hématéine, est obtenu par l'oxydation de l'hématoxyline. Pour obtenir un pouvoir colorant, il faut en plus y ajouter une base comme l'alumine ou un sel métallique. Ce complexe réagit avec les acides nucléiques pour colorer en bleu-violet les noyaux des cellules et les parties du cytoplasme riches en acides ribonucléiques. Le laboratoire utilise de l'hémalum de Mayer qui associe hématoxyline et alun de potassium ;
- **La phloxine** est un sel de sodium de la fluorescéine chlorée. Il s'agit d'un colorant artificiel provenant des hydrocarbures extraits du goudron de houille. La phloxine réagit essentiellement par force électrostatique avec les acides aminés basiques tels que l'histidine, l'arginine ou la lysine et colore dans des nuances de rose/rouge le cytoplasme, la matrice extracellulaire, les fibres musculaires et les globules rouges ;
- **Le Safran** permet d'améliorer le contraste du tissu conjonctif. La coloration est due à un caroténoïde naturel retrouvé dans les fleurs de *crocus sativus* : la crocine. Il s'agit d'un diester formé d'un acide dicarboxylique, la crocétine, liée à chaque extrémité par un sucre simple (le gentiobiose). Ce colorant se fixe sur des substances acidophiles.

La méthode est **qualitative** puisque le résultat n'apporte pas d'information sur une quantité mais sur la répartition topographique des composants tissulaires et cellulaires d'un échantillon permettant ainsi d'en réaliser une analyse morphologique.

La méthode de coloration standard n'est pas une méthode normalisée ou une méthode fournisseur. Il s'agit d'une **méthode établie à partir de données bibliographiques et adaptée par le laboratoire** pour le fonctionnement du service. Ainsi, le périmètre d'accréditation demandée était une **portée flexible étendue de type B**.

Les « analytes » sont les structures tissulaires et cellulaires des prélèvements fixés et inclus en paraffine.

La finalité de la méthode est le diagnostic de processus pathologiques éventuels.

## **5. Recherches bibliographiques**

Les recherches bibliographiques ont été réalisées à partir des ressources documentaires du service, des manuels fournisseurs, d'Internet et de la base de données PubMed.

Concernant la technique de coloration proprement dite, elle avait été établie en utilisant les données fournisseur (manuels des automates, fiches techniques des réactifs, etc.) et deux ouvrages de référence en histologie (23,24), puis adaptée au fonctionnement du laboratoire (notamment avec l'ajout de Safran).

L'organisation générale du service respecte déjà les recommandations de l'AFAQAP : *RBPACP* et *Gestion d'une structure ACP - Recommandations et réglementations* (12,13)

Nous n'avons pas trouvé de données concernant les performances attendues de la méthode et les limites d'acceptabilité.

La définition de critères objectifs pour l'évaluation de la qualité de la coloration standard s'est appuyée sur les critères utilisés par l'AFAQAP pour le programme d'EEQ pour la coloration HE/HES en 2014 (25) et les critères d'évaluation des colorations histologiques développés par le Quality management Program Laboratory Services (Québec) (26). Ces critères sont définis un peu plus loin.



L'influence des conditions pré-analytiques sur la qualité de la coloration standard est très peu documentée dans la littérature. Seule l'influence de la durée de l'ischémie froide (temps entre l'excision et la fixation) a fait l'objet d'études qui rapportent une diminution du compte mitotique lorsque l'ischémie froide est prolongée plus d'une heure, en rapport avec une diminution de la qualité morphologique rendant plus difficile le compte mitotique. (27–30)

Le problème de la contamination inter-échantillons est mieux documenté. Le Collège des Pathologistes Américain a réalisé en 1996 une étude sur 275 laboratoires afin d'évaluer la fréquence de la présence d'une contamination inter-échantillons (31). 321757 lames ont été analysées de façon prospective et 57883 de façon rétrospective. La fréquence d'une contamination inter-échantillons était de 0,6% pour l'analyse prospective et de 2,9% pour l'analyse rétrospective. Une analyse similaire a été réalisée par Layfield LJ et al. en 2011 (32). Dans cette étude, l'analyse rétrospective de 521 661 lames et l'analyse prospective de 1000 lames supplémentaires retrouve une fréquence de contamination de 0,01% à 1,2%.

## **6. Détermination des performances attendues, des limites d'acceptabilité et des objectifs analytiques**

Les performances et objectifs analytiques de la technique de coloration standard en histologie ne font pas l'objet de recommandations particulières ni de publications de « l'état de l'art ».

L'appréciation de la qualité d'une coloration est un paramètre subjectif pour lequel il n'existe pas de critères consensuellement admis. Chaque pathologiste peut avoir sa préférence en termes de dominante de couleur, d'intensité de coloration, de contraste... Afin de disposer de critères uniformes dans le service pour harmoniser l'évaluation de la qualité de coloration, une fiche d'évaluation a été élaborée à partir de données bibliographiques en s'inspirant des critères de l'AFAQAP pour l'EEQ de la coloration HE/HES en 2014 (23) et des critères d'évaluation de colorations histologiques développés par le Quality management Program Laboratory Services (Quebec) (24).

Cette fiche détaille les critères histologiques et cytologiques d'une coloration de bonne qualité (**Annexe 2**).

Afin d'en simplifier l'utilisation quotidienne, une grille d'évaluation globale selon 4 lettres (A=optimal, B=Bon, C=moyen, D=insuffisant) a été réalisée.

Une limite d'acceptabilité a été fixée : une lame est « acceptée » si elle obtient une lettre A ou B et « rejetée » si elle obtient une lettre C ou D

La grille et la limite d'acceptabilité ont été validées par l'ensemble des pathologistes du service. Elles sont dorénavant utilisées pour évaluer la qualité du CIQ quotidien et ont servi de référence pour les lames des tests des dossiers de validation.

Les objectifs analytiques de la coloration standard en histologie ne faisant pas l'objet de recommandations particulières, nous avons fixé des objectifs analytiques propres au laboratoire. L'objectif analytique de la technique était d'obtenir 95% de lames « acceptées » c'est-à-dire ayant obtenues une note A ou B par les 3 pathologistes observateurs. Pour la comparaison des méthodes, l'évaluation porte sur la concordance des résultats des 2 automates de coloration sur le critère lame acceptée ou rejetée. L'objectif fixé était d'obtenir 95% d'évaluations concordantes. En cas de discordance une analyse systématique devra être réalisée.

## **7. Choix du matériau de référence**

Il n'existe pas de matériau de référence certifié pour la coloration histologique standard. Afin de disposer d'un matériau de référence au sein du laboratoire, des lames « gold standard » ont été sélectionnées. Ces lames devaient avoir un résultat de coloration évalué A (note maximale) et ont été choisies afin de couvrir les domaines principaux d'activité du laboratoire (gynécologie, hématologie, pathologie digestive).

Au total, 8 lames ont été sélectionnées correspondant à un échantillon d'estomac tumoral, d'iléon normal, de foie tumoral, deux échantillons de sein normal et un de sein tumoral, un échantillon d'utérus normal et un ganglion lymphomateux. Ce choix a été approuvé par l'ensemble des pathologistes du service en réunion.

## 8. Analyse des risques et des modalités de maîtrise

En histologie, toutes les étapes de la phase pré-analytique peuvent avoir une influence sur la qualité de la coloration : la qualité du prélèvement, les conditions et délais d'acheminement, les durées d'ischémie froide et de fixation, la macroscopie, la déshydratation, l'enrobage, la coupe, etc. sont autant d'étapes préliminaires qui doivent être maîtrisées avant l'étape de coloration.

L'analyse des grandeurs d'influence et modalités de maîtrise a donc concerné toutes ces étapes. Le groupe de travail au complet a participé à cette analyse pour bénéficier d'un regard croisé médico-technique.

Nous nous sommes appuyés dans un premier temps sur la réalisation d'un diagramme de causes et effets ou diagramme d'Ishikawa (**Figure 4**)



**Figure 4. Diagramme de causes et effets pour la coloration standard en histologie**

Dans un second temps, ces données ont été reprises de façon plus approfondie, étape par étape, du prélèvement à la coloration, en identifiant pour chaque grandeur d'influence les modalités de maîtrise mises en place au laboratoire. L'analyse complète figure dans le dossier de validation (**Annexe 3**).

Concernant la métrologie, les exigences ont été évaluées avec la cellule métrologie. Les enceintes thermiques considérées comme critiques sur le plan métrologique sont : le réfrigérateur où sont stockées les lames blanches, l'étuve où est stockée la paraffine fondue et l'étuve pour le séchage des lames après la coupe et avant la coloration. La température de ces trois enceintes est surveillée en continu par un logiciel informatique (SIRIUS) avec émission d'une alarme lorsque les limites de température définies sont dépassées. Ces enceintes font également l'objet d'un étalonnage régulier par un prestataire externe accrédité.

La température ambiante de la pièce où est situé l'automate de coloration n'a pas été considérée comme critique sur le plan métrologique car la plage de température recommandée par le fabricant est large (15 °C à 35 °C) et l'automate se trouve dans une pièce dont la température est contrôlée par climatisation.

Le petit matériel (balances, règles) utilisé en macroscopie n'a pas été considéré comme critique car les mesures réalisées n'apportent qu'un complément d'information, sans influence sur la qualité de la technique.

Cette étape d'analyse de risques et des modalités de maîtrise a été l'occasion de faire le point sur les procédures et modes opératoires à actualiser ou modifier. Cela nous a également permis d'identifier de nouvelles modalités de maîtrise à mettre en place, comme par exemple le suivi des dates de péremption des lots de formol tamponné 4% délivrés par le laboratoire aux services de radiologie et endoscopie sous forme de pots pré-remplis de formol.

## **9. Vérification et actualisation des documents concernés**

Tous les documents utiles à la validation ont été relus. Des actualisations et améliorations ont été apportées. Elles ont notamment porté sur les habilitations (redéfinition plus précise de certains critères), la gestion des CIQ (amélioration des modalités d'évaluation) et des EEQ (modalités d'exploitation des résultats), les modalités

de transport entre le bloc opératoire et le laboratoire (mise en place d'un pneumatique) et la traçabilité des dates de péremption des lots de fixateurs données aux services de radiologie et endoscopie.

Aucun nouveau document n'a été rédigé.

## **10. Détermination des paramètres à vérifier et mise au point du plan expérimental**

D'après les recommandations du *SH GTA 04 – Révision 00* que nous avons vu dans la partie méthodologie (**Tableau 2**, page 33), les paramètres à vérifier pour la validation d'une méthode qualitative étaient : la sensibilité diagnostique et la spécificité analytique, la comparaison avec une méthode de référence et/ou une autre méthode utilisée au laboratoire, la contamination inter-échantillons, la robustesse et la stabilité des réactifs. Bien que non recommandée nous avons souhaité procéder également à une comparaison inter-laboratoires.

### **a) Sensibilité diagnostique et spécificité analytique**

#### Définition :

La sensibilité diagnostique d'une méthode est la probabilité que le résultat soit positif si la condition recherchée est présente.

La spécificité analytique ou « sélectivité » est l'aptitude d'une méthode à mesurer l'analyte ou la caractéristique recherchée sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.

#### Méthode :

La coloration histologique standard en tant que telle ne peut pas faire l'objet d'un calcul de sensibilité ni de spécificité, d'une part car il n'y a pas de matériau de référence et d'autre part car ce n'est pas une condition ou une caractéristique en particulier qui est recherchée. La technique permet en effet d'observer une multitude de caractéristiques morphologiques des cellules et des tissus, qui pourront ensuite être interprétées.

Néanmoins, pour répondre en partie et de façon « détournée » à ces exigences, nous avons choisi d'étudier la spécificité analytique de chaque colorant en colorant 3 lames

issues du même bloc avec uniquement de l'hémalun, uniquement de la phloxine et uniquement du safran, afin de vérifier que chaque colorant colore uniquement les structures qu'il est sensé colorer.

Pour la sensibilité, nous avons utilisé le résultat obtenu à l'EEQ de l'AFAQAP pour la coloration histologique standard en 2014, en considérant qu'un bon résultat à ce test montrait que les couleurs étaient là où elles étaient attendues.

## **b) Comparaison des méthodes**

### Définition :

La comparaison des méthodes consiste à comparer la méthode à valider avec une méthode de référence ou avec une autre méthode utilisée au laboratoire.

### Méthode :

Dans le cas de la coloration standard en histologie, il n'existe pas de méthode de référence. Le laboratoire disposant de 2 automates de coloration, la comparaison a consisté en 30 échantillons de tissus sains et pathologiques coupés en double exemplaire, chaque exemplaire étant ensuite coloré sur l'un des 2 automates, en même temps. Les 60 lames devaient ensuite être appréciées de façon indépendante par 3 pathologistes du service, en utilisant la grille d'évaluation de la qualité de la coloration et la limite d'acceptabilité fixée. Ainsi, une lame était acceptée si elle obtenait une évaluation A ou B par les 3 pathologistes observateurs ; elle était rejetée dans le cas contraire. La concordance des 2 méthodes était évaluée sur le critère lame « acceptée » ou « rejetée ».

## **c) Contamination inter-échantillons**

### Définition :

« Des phénomènes de contamination entre échantillons peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques. Une étude de contamination inter-échantillons est à effectuer pour tous les systèmes automatisés. » (SH GTA 04 (19))

### Méthode :

Afin d'étudier ce paramètre, nous avons décidé d'intercaler les 30 lames utilisées pour la comparaison des méthodes avec des lames de routine (1 lame test / 1 lame de routine /

1 lame test / 1 lame de routine, etc.). Une colonne spécifique permettait ensuite aux observateurs de signaler une contamination inter-échantillons lors de l'évaluation.

#### d) Robustesse

##### Définition :

« La robustesse d'une procédure d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. Ces variations, faibles, correspondent à l'écart d'un paramètre opératoire par rapport à sa valeur nominale définie dans la méthode. » (SH GTA 04 (17)).

##### Méthodes :

L'étude de la robustesse a porté sur les variations suivantes :

- **Phase pré-analytique différente** : le laboratoire reçoit des demandes d'avis d'autres laboratoires souvent accompagnées d'un bloc de tissu représentatif. Le pré-traitement de ces échantillons n'est pas maîtrisable par le laboratoire et le plus souvent inconnu. Afin d'évaluer l'impact de ce paramètre, nous avons choisi de couper et colorer 10 blocs provenant d'autres laboratoires.
- **Durée de conservation des lames blanches** : dans le laboratoire, les lames blanches peuvent être conservées pendant un mois au réfrigérateur (entre +2 et +6°C). Nous avons coupé et coloré 5 lames blanches issues du même bloc, conservées au réfrigérateur et colorées à J1, J7, J14, J21, et J28.
- **Durée de fixation différente** : La durée de fixation appliquée dans le laboratoire est de 6 heures minimum pour les biopsies, 24 à 48 heures pour les petites pièces opératoires et 48 à 72 heures pour les pièces opératoires plus volumineuses. Néanmoins, les durées de fixation peuvent être allongées dans le cas d'un week-end ou jour férié. Pour évaluer l'impact de la variation du temps de fixation sur le rendu de coloration, nous avons sélectionné à l'état frais 6 échantillons de la même pièce opératoire qui ont été fixés pendant 5, 29, 41, 77, 101 heures et 7 jours.
- **Epaisseur de coupe** : Les coupes pour coloration standard sont réalisées à 3 microns. Nous avons décidé de couper et colorer 4 lames d'un même bloc à 2, 3, 4 et 5 microns.

- **Température ambiante** : La température du laboratoire est maîtrisée grâce à un système de climatisation. Néanmoins, le laboratoire étant situé dans le sud de la France, la température ambiante est susceptible de varier de quelques degrés entre les mois d'été et d'hiver. Pour vérifier l'influence de ce paramètre, nous avons comparé les résultats des CIQ quotidiens des 2 premières semaines d'août 2014 et des 2 premières semaines de février 2015.

- **Opérateur de la technique** : Seuls les techniciens formés et habilités au poste de coloration sont opérateurs de la technique. La coloration est réalisée chaque semaine par différents techniciens, selon un planning permettant de tracer l'opérateur. Afin d'objectiver une éventuelle différence de qualité inter-opérateurs, nous avons analysé de façon rétrospective les dysfonctionnements signalés en 2014, en fonction du planning technique.

- **Taille des lames** : dans certains cas, les prélèvements réalisés en macroscopie sont inclus dans des blocs de plus grande taille (« méga blocs ») et les coupes sont ensuite positionnées sur des plus grandes lames, dites « grandes lames » ou « méga lames ». Ces grandes lames étant uniquement colorées par cet automate, nous n'avons pas pu faire de comparaison des méthodes et nous avons inclus la taille de la lame dans l'analyse de robustesse. Nous avons sélectionné 3 échantillons de grande taille, puis évalué ces lames selon les critères de qualité habituels.

#### e) Stabilité des réactifs

##### Définition :

Etudier la stabilité des réactifs consiste à évaluer si les réactifs « embarqués » dans un automate sont stables au cours du temps.

##### Méthode :

Les colorants sont changés une fois par semaine et les autres bains (alcool, histolemon...) quotidiennement. Le laboratoire réalise déjà une veille constante de la stabilité des réactifs grâce au passage quotidien d'un CIQ.

Pour le dossier de validation de méthode nous avons ré-évalué les lames de CIQ quotidiens de 4 semaines consécutives pour objectiver une éventuelle différence de qualité en fonction de la durée de conservation des réactifs.



## **f) Comparaison inter-laboratoires**

Bien que non exigée dans un dossier de validation, une comparaison inter-laboratoires a été réalisée. La comparaison a consisté en 8 échantillons de tissus sains et pathologiques coupés en 4 exemplaires. Deux exemplaires ont été colorés au laboratoire par les deux automates. Les 2 autres exemplaires ont été confiés à 2 autres laboratoires d'ACP, l'un dans le secteur privé et l'autre dans le secteur public.

### **11. Mise en œuvre expérimentale et évaluation des lames test**

La sélection des échantillons a été réalisée durant 5 semaines consécutives. Ces échantillons concernent des tissus sains et pathologiques et ont été choisis de façon à couvrir l'ensemble des spécialités prises en charge dans le service. Les échantillons ont été sélectionnés en macroscopie pièces fixées et ont subi le même traitement que la pièce opératoire dont ils ont été issus.

Les expériences ont été réalisées par 2 techniciennes selon le plan expérimental décrit. Pour la comparaison des méthodes et la comparaison inter-laboratoires, les lames ont été appréciées de façon indépendante par 3 pathologistes du service en utilisant la grille d'évaluation de la qualité de la coloration. Pour les autres paramètres étudiés, les lames ont été appréciées par le pathologiste responsable du dossier de validation. Chaque observateur a rempli un formulaire d'évaluation des lames comportant la note attribuée à chaque lame et des commentaires éventuels. Ces enregistrements ont été archivés avec le dossier de validation pour en assurer la traçabilité.

### **12. Résultats**

Les résultats ont été compilés sous forme de tableaux qui figurent dans le dossier de validation (**Annexe 3**).

#### **a) Sensibilité diagnostique et spécificité analytique**

La coloration unique par l'hémalum, la phloxine et le safran confirme la spécificité des colorants : coloration nucléaire en bleu avec l'hémalum, coloration des cytoplasmes et

stroma en nuances de rouge/rose avec la phloxine et coloration du stroma, fibres et collagène en jaune/orangé avec le safran.

Pour la sensibilité : le laboratoire a obtenu la note A (optimale) à l'EEQ de l'AFAQAP en 2014.

### **b) Comparaison des méthodes**

Les 60 lames ont obtenu une évaluation A ou B par les 3 pathologistes observateurs : 100% des lames ont été acceptées. La totalité des lames ayant été acceptées pour les 2 méthodes, la concordance des 2 méthodes est parfaite (100% des évaluations sont concordantes sur le critère lame acceptée ou rejetée).

### **c) Contamination inter-échantillons**

Sur les 60 lames analysées, aucune contamination inter-échantillons n'a été signalée par aucun des 3 pathologistes observateurs.

### **d) Robustesse**

- **Phase pré-analytique différente** : les 10 lames issues de blocs d'autres laboratoires ont toutes été évaluées A ou B.

- **Durée de conservation des lames blanches** : les 5 lames blanches conservées au réfrigérateur et colorées à J1, J7, J14, J21, et J28 ont obtenu une évaluation A.

- **Durée de fixation différente** : L'échantillon ayant fixé pendant 5 heures a reçu une évaluation B, les autres lames ont toutes été évaluées A.

- **Epaisseur de coupe** : les 4 lames d'un même bloc coupées à 2, 3, 4 et 5 microns ont obtenu une évaluation A.

- **Température ambiante** : Pas de différence de qualité constatée entre les 2 premières semaines d'août 2014 et des 2 premières semaines de février 2015.

- **Opérateur de la technique** : Pas de différence de qualité inter-opérateurs constatée de façon rétrospective sur 2014.

- **Taille des lames** : les 3 « grandes lames » ont obtenu une évaluation A ou B.

#### **e) Stabilité des réactifs**

Sur les 4 semaines consécutives, tous les CIQ quotidiens ont été évalués A ou B. La stabilité des colorants est validée pendant 5 jours.

#### **f) Comparaison inter-laboratoire**

Les 32 lames ont été évaluées A par les 3 pathologistes observateurs. Les 4 méthodes de coloration donnent des résultats comparables.

### **13. Conclusion et rédaction du dossier**

Les tests réalisés sont conformes et permettent de confirmer la validité opérationnelle de la technique.

L'ensemble des dossiers de validation au sein du DBC doivent être rédigés selon les formulaires proposés par le COFRAC. S'agissant d'une méthode qualitative, la rédaction de notre dossier de validation a été faite d'après le SH FORM 44 qui était en vigueur à ce moment-là. Il figure en **annexe 3**. Pour des raisons de confidentialité, les numéros d'enregistrement des blocs et lames et les références des documents internes ont été changés.

### **14. Suivi de la méthode et de la démarche qualité**

Le suivi de la méthode est assuré par le passage quotidien du CIQ validé par un pathologiste habilité. Si la qualité est inférieure à la limite d'acceptabilité, un dysfonctionnement est signalé et le problème doit être résolu avant le passage des

lames de routine. La présence de 2 automates permet d'assurer le fonctionnement du service en cas de panne ou de maintenance de l'un d'entre eux. Le laboratoire participe également, tous les ans, à l'EEQ de la coloration standard proposée par l'AFAQAP. Il existe de plus une veille continue de la qualité puisque chaque lame colorée est interprétée par un pathologiste.

Le nombre de non-conformités est pris comme indicateur du processus de coloration standard et fera l'objet d'un suivi bi-annuel.

Le dossier de validation devra être complété de nouveaux essais si des éléments de la méthode sont modifiés.

#### **D. Le déroulement de l'évaluation COFRAC**

L'évaluation par le COFRAC a eu lieu les 19 et 20 mai 2015.

L'évaluation a commencé par une **réunion d'ouverture**, réunissant les évaluateurs du COFRAC et les responsables de chaque plateau technique du DBC. L'équipe d'évaluateurs comprenait un évaluateur qualitatif, plus particulièrement chargé d'examiner les dispositions organisationnelles de la structure, et un évaluateur technique pour chaque plateau technique à évaluer (ACP, hématologie cellulaire, cytogénétique, etc.) Les évaluateurs se sont présentés. L'évaluateur qualitatif, également responsable de l'évaluation, en a rappelé les objectifs, les référentiels applicables, le planning prévu et les modalités d'évaluation. Les représentants du laboratoire se sont également présentés et ont ensuite exposé brièvement les activités du laboratoire et son organisation.

L'évaluation des dispositions organisationnelles et les évaluations des différents plateaux techniques se sont ensuite déroulées en parallèle.

**L'évaluation des dispositions organisationnelles** a été réalisée par l'évaluateur qualitatif. Elle a notamment concerné le document d'engagement, la gestion documentaire, la gestion des risques, les revues de direction, le traitement des réclamations, la maîtrise des non-conformités (actions correctives et préventives), la

gestion des sous-traitances, la gestion et l'évaluation des services supports, les prestations de conseils, les usages de la marque COFRAC, etc.

**L'évaluation technique** du plateau technique d'ACP a commencé par une visite générale du laboratoire. L'auditeur a ensuite observé la réalisation des activités en s'entretenant avec le personnel concerné à chaque étape. Il a demandé à voir en détail les éléments des processus pré-analytiques, analytiques et post-analytiques. L'évaluation des processus analytiques a concerné uniquement la portée d'accréditation déjà obtenue (immunohistochimie qualitative avec l'anticorps anti-CD117) et l'extension demandée pour la coloration standard. Plusieurs tests de traçabilité ont été réalisés, notamment concernant la traçabilité des différentes étapes de la réalisation d'un examen histologique standard (réception, enregistrement, macroscopie, inclusion, coupe, coloration, rendu des lames, interprétation, saisie et validation du compte rendu). Les modalités des CIQ et EEQ ont aussi été vérifiées ainsi que le traitement des non-conformités dans la pratique quotidienne.

L'auditeur a aussi évalué la pertinence des contrôles métrologiques notamment pour les enceintes thermiques considérées comme critiques dans les dossiers de validation.

Une **réunion de clôture** a eu lieu à la fin des deux journées d'évaluation. Elle a pour but d'établir un « constat objectif » suite aux investigations de l'équipe d'évaluation. Chaque évaluateur a exposé les points forts qu'il avait relevés et les éventuels écarts et axes d'amélioration.

Concernant le dossier de validation de la coloration standard, l'évaluateur technique a énoncé en « points forts » l'analyse de risques très détaillée et les nombreuses modalités de maîtrise développées par le laboratoire, les références bibliographiques pertinentes et un plan expérimental globalement adapté par rapport aux performances à vérifier. Un **écart non critique** a néanmoins été formulé : l'évaluateur a estimé que le nombre de "mégablocs" testés par la validation des méthodes était insuffisant.

Le caractère non critique était justifié ainsi dans la fiche d'écart :

« Conséquence avérée : Non constatée lors de l'audit, les techniques sont très proches et le dispositif de validation des préparations est efficient.

Risque induit : Faible, car la technique est systématiquement validée par une veille optique continue »

Pour répondre à un écart, le laboratoire doit formaliser un « **plan d'action** » qui est à retourner à l'évaluateur sous 15 jours à compter de la réunion de clôture. Ce plan d'action doit comporter une analyse de l'étendue de l'écart, une analyse des causes et de la nécessité de mettre en place des actions pour éviter la reproduction de l'écart et enfin les actions (correctives et/ou préventives) prévues pour maîtriser la situation.

Pour répondre à l'écart formulé, le laboratoire a décidé de réaliser 10 essais supplémentaires sur des « mégablocs » selon le même protocole : échantillons sélectionnés en macroscopie pièces fixées, suivant la même prise en charge que la pièce opératoire dont ils sont issus, intercalés avec des lames de routine pour vérifier l'absence de contamination inter-échantillons et évalués selon la même grille de qualité.

## **V. MISE EN PRATIQUE : la validation de méthode appliquée à la cytologie cervico-utérine au centre hospitalier de la Timone à Marseille**

### **A. Présentation de la structure et du système institutionnel de la qualité**

#### **1. L'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille**

Avec 4 hôpitaux et 3 400 lits, l'Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille (AP-HM) est le 3ème Centre Hospitalier Universitaire de France. C'est aussi le premier employeur de la région, avec plus de 12 000 salariés et près de 2000 médecins.

Ses missions sont le soin, la formation, la recherche ainsi que la prévention et l'éducation à la santé.

Chaque année, 125000 entrées sont enregistrées, 70 000 interventions chirurgicales sont pratiquées et 900 000 consultations sont effectuées.

#### **2. L'hôpital de la Timone**

Créé en 1974 au sein de l'AP-HM, le Centre Hospitalier de la Timone est le plus important de la région Provence Alpes Cote d'Azur. Il est considéré par son activité, son équipement et ses moyens humains comme le troisième hôpital européen.

Il comprend un hôpital d'adultes et un Bâtiment Médico-Technique (Timone 2) ainsi qu'un hôpital d'enfants.

L'hôpital emploie environ 4400 personnels non médicaux et 1000 médecins. Il comporte 1069 lits et 30 blocs opératoires.

#### **3. Le service d'anatomie et cytologie pathologiques et de neuropathologie**

Au sein de l'hôpital, le service d'anatomie et cytologie pathologiques et de neuropathologie (ACPNP) fait partie d'un pôle médical, associé au Centre de Ressources Biologiques Tumorothèque et Banque de muscle (CRB TBM), aux services de dermatologie, de chirurgie digestive et générale, de chirurgie générale et transplantations hépatiques, d'hépto-gastro-entérologie, d'oncologie digestive,

d'oncologie médicale, de radiothérapie et au centre d'information et de soin de l'immunodéficience humaine.

Le service est composé de 12 médecins pathologistes (3 PU-PH, 2 MCU-PH, 3 PH temps plein, 2 PH mi-temps, un AHU et un assistant spécialiste), de 25 techniciens de laboratoire (environ 24 équivalent temps plein), 2 aides laboratoire, 7 secrétaires, une cadre de santé médico-technique et une ingénieure qualité. Le service accueille 5 à 7 internes en médecine par semestre (**Annexe 4**).

Les activités du laboratoire couvrent la neuropathologie, la pathologie digestive, l'urologie, la néphrologie, la dermato-pathologie, l'hématologie, les pathologies des os et des tissus mous, la gynécologie, l'endocrinologie, l'oto-rhino-laryngologie, les tumeurs pédiatriques, la pathologie infectieuse, la pathologie cardiaque et vasculaire et la foetopathologie.

Le laboratoire traite environ 3000 frottis cervico-utérin (FCU) par an.

#### **4. Le système institutionnel de la qualité**

Au sein de l'AP-HM, la démarche qualité est pilotée par un pôle qualité (POLQUA). Il s'agit d'un pôle médico-administratif qui coordonne la mise en œuvre de la politique qualité de l'AP-HM.

Le Laboratoire de Biologie Médicale de l'AP-HM (regroupant les spécialités biologiques de biochimie, hématologie, immunologie, pharmacologie, toxicologie, génétique, biologie cellulaire, oncologie biologique, biologie moléculaire et procréation médicale assistée) est accrédité selon la norme 15189 pour une partie de ses techniques.

Le Centre de Ressources Biologiques (CRB) de l'AP-HM est engagé dans une démarche de certification selon la norme NF EN ISO 9001 et la norme NF S96-900 : Qualité des centres de ressources biologiques, dont l'évaluation aura lieu d'ici la fin de l'année. Il regroupe 3 CRB : le CRB HV (hématologie vasculaire), le CRB TAC (Tissus ADN Cellules) et le CRB TBM (tumorothèque et banque de muscle). Le CRB HV et le CRB TAC font partie du LBM. Le CRB TBM est quant à lui étroitement lié au service d'ACPNP puisqu'ils font partie du même pôle, partagent la même direction, responsable qualité et cadre de santé, ainsi que certains documents et certains membres du personnel.



Dans le laboratoire d'ACPNP, une démarche qualité a été initiée dès 2005. L'arrivée d'une ingénieure qualité en 2007 a renforcé cette démarche.

Une réunion de l'ensemble du personnel du service à lieu une fois par mois. Des réunions de chaque secteur (cytologie, macroscopie, immunohistochimie, etc.) sont aussi planifiées régulièrement.

La gestion documentaire du laboratoire est réalisée dans un logiciel commun à tous les laboratoires de l'AP-HM (GesQual).

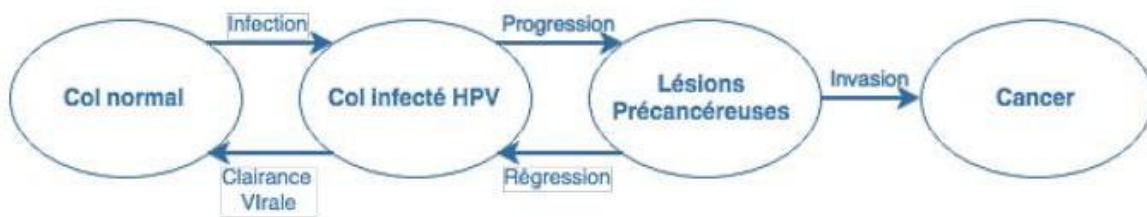
Le laboratoire d'ACPNP n'est, pour l'instant, pas accrédité. La réalisation de ce premier dossier de validation s'inscrit dans une volonté du service d'initier une démarche d'accréditation.

## **B. La cytologie cervico-utérine : un examen incontournable pour le dépistage du cancer du col de l'utérus**

### **1. Le cancer du col de l'utérus**

Le cancer du col de l'utérus est la 12<sup>ème</sup> cause de cancer chez la femme. Son incidence et la mortalité qui lui est associée (2797 nouveaux cas et 1 092 décès estimés en 2015 en France) diminuent depuis plus de 30 ans, notamment grâce au dépistage par FCU, qui permet de dépister des lésions pré-invasives ou des cancers à un stade précoce(33).

L'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus se déroule selon un continuum de lésions histologiques précancéreuses (lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade et de haut grade). Celles-ci font suite à la persistance de l'infection par un papillomavirus humain (HPV) oncogène à haut risque. 8 génotypes sont impliqués dans presque 90 % des cancers du col utérin (par ordre de fréquence : 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35). Pour chaque grade de lésion cervicale précancéreuse, il existe une probabilité de régression vers un épithélium normal et une probabilité de persistance ou de progression vers un stade plus avancé. (**Figure 5**)



**Figure 5. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus**

D'autres facteurs peuvent favoriser le développement du cancer du col de l'utérus : les rapports sexuels à un âge précoce, la multiplicité des partenaires, la multiparité, le tabagisme, l'utilisation prolongée de contraceptifs hormonaux, l'immunosuppression ou certaines infections (Chlamydia Trachomatis ou virus de l'herpès simplex de type 2).

Ainsi, un cancer du col met en moyenne 15 à 20 ans pour se développer après la persistance d'une infection HPV à haut risque. Cette histoire naturelle longue est propice à un dépistage grâce à la cytologie cervico-utérine.

## 2. La cytologie cervico-utérine

La cytologie moderne telle que nous la connaissons actuellement a une paternité attribuée à Geórgios Nikoláou Papanikoláou qui a notamment mis au point le FCU (34).

L'examen consiste à prélever des cellules superficielles au niveau du col de l'utérus qui seront ensuite examinées au microscope. L'observation au microscope permet de reconnaître le type de cellules présentes, d'analyser leur morphologie et les éventuelles anomalies cellulaires afin de les interpréter et d'établir un diagnostic.

On distingue deux grands types de techniques : la cytologie conventionnelle et la cytologie en milieu liquide.

**En cytologie conventionnelle**, le prélèvement s'effectue avec une spatule d'Ayre associée à une brosse endocervicale, une spatule d'Ayre modifiée ou des dispositifs spécifiques qui permettent de prélever à la fois au niveau de l'orifice cervical externe et au niveau de l'endocol. Le préleveur étale lui-même le prélèvement sur des lames qui sont ensuite séchées avec un fixateur en spray, puis envoyées au laboratoire.

La lecture des frottis conventionnels est un travail fastidieux et des essais de lecture de frottis assistée par ordinateur ont été initiés dès le début des années 1970. Il est vite apparu que pour utiliser une lecture automatisée, la préparation devait être la plus homogène possible et en couche cellulaire mince.

**La cytologie en milieu liquide** a été développée dans ce but aux Etats-Unis, à partir des années 1980 : les cellules sont mises en suspension dans un milieu liquide fixateur puis sont étalées sur lame par centrifugation, sédimentation ou filtration (35).

Elle a un coût plus important mais présente de nombreux avantages :

- standardisation de la technique de prélèvement, de la fixation et de l'étalement ;
- lyse des globules rouges et élimination d'une grande partie des cellules inflammatoires qui peuvent masquer les cellules à analyser ;
- rapidité de lecture : une seule lame, petite surface de lecture homogène ;
- possibilité de réaliser des techniques complémentaires telles que l'immunocytochimie (double immuno-marquage p16/Ki67) ou la biologie moléculaire ;
- possibilité d'automatisation de la lecture.

Concernant l'efficacité, de très nombreuses études ont comparé ces deux techniques. Les revues de la littérature les plus récentes (36–40) montrent qu'elles sont à peu près équivalentes en ce qui concerne leurs performances diagnostiques, avec une spécificité comparable et une sensibilité discrètement augmentée par la cytologie en milieu liquide pour les lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade.

La cytologie en milieu liquide diminue le nombre de frottis « non satisfaisants » mais de façon modeste, avec cependant de grandes différences d'une étude à l'autre.

Les recommandations concluent en général que ces deux méthodes sont équivalentes pour la détection des lésions pré-néoplasiques ou malignes mais que la plus grande variété d'examens réalisables à partir d'un frottis sur milieu liquide rend l'utilisation de la technique monocouche préférable. (38,41)

Quelle que soit la technique, la cytologie est ensuite observée au microscope afin de diagnostiquer une éventuelle anomalie. La classification cytologique des lésions du col utérin utilise le « Système Bethesda ». Il s'agit d'une terminologie internationale

permettant de classer les différentes anomalies observées et dont la dernière révision a été faite en 2014 (42).

Le système comprend une évaluation de la qualité du prélèvement (satisfaisant ou non satisfaisant pour l'évaluation) et plusieurs catégories diagnostiques :

- Négatif pour une lésion intra-épithéliale ou maligne,
- Cellules malpighiennes atypiques de signification indéterminée (ASC-US),
- Cellules malpighiennes atypiques ne permettant pas d'éliminer une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (ASC-H),
- Lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade (LSIL),
- Lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (HSIL),
- Carcinome épidermoïde,
- Atypies des cellules glandulaires, endocervicales ou endométriales,
- Atypies des cellules glandulaires, endocervicales ou endométriales en faveur d'une néoplasie,
- Adénocarcinome, in situ ou infiltrant, endocervical ou endométrial,
- Adénocarcinome d'origine extra-utérine,
- Autre tumeur maligne.

### **3. Du dépistage individuel au dépistage organisé**

Actuellement, en France, le dépistage du cancer du col de l'utérus est un dépistage individuel : il est recommandé de réaliser un FCU chez toutes les femmes de 25 à 65 ans tous les trois ans (après deux FCU normaux réalisés à un an d'intervalle).

Ce dépistage individuel est partiellement pratiqué avec un taux de couverture global estimé entre 50 et 60 %. Ce taux est marqué par d'importantes inégalités de recours par tranches d'âge, situations géographiques, économiques et culturelles (43).

Entre 2010 et 2012, une expérimentation de dépistage organisé a été réalisée dans 13 départements, pilotée par la Direction Générale de la Santé. L'expérimentation consistait à inciter toutes les femmes de 25 à 65 ans qui n'avait pas spontanément réalisé le dépistage individuel dans les trois années précédentes, à réaliser un FCU. Les femmes qui ne répondaient pas à cette incitation recevaient ensuite une relance 9 à 12 mois plus tard. Au total, 1 319 660 femmes ont été incitées et 455 572 ont été relancées. Les résultats montrent que, sur la période d'expérimentation, le taux de couverture du

dépistage dans ces 13 départements a été de 62 %, dont 12% attribués au dépistage organisé (44).

La mise en place d'un programme national de dépistage organisé fait partie des objectifs du plan cancer 2014-2019. L'objectif est de passer à 80% de taux de couverture et de diminuer l'incidence et le nombre de décès par cancer du col utérin de 30% à 10 ans (43).

L'Institut National du Cancer (INCa) a rédigé un cahier des charges pour la généralisation de ce dépistage organisé (45).

Concernant l'ACP, ce cahier des charges insiste notamment sur :

- L'évaluation des pratiques professionnelles et la formation professionnelle continue des pathologistes et cytotechniciens ;
- La mise en place d'un contrôle de qualité interne qui « correspond à l'ensemble des mesures prises par les structures d'ACP pour évaluer en permanence la qualité des examens effectués et pour permettre l'obtention de résultats fiables et reproductibles. Il doit notamment s'assurer :
  - Du respect d'un référentiel (procédures écrites etc.),
  - Du respect et de la pérennisation de ce référentiel par l'institution d'une révision périodique de ces procédures,
  - D'une définition des non-conformités en lien avec les procédures appliquées et d'un recueil de ces non-conformités,
  - D'une revue périodique des non-conformités et des actions correctives et préventives mises en place,
  - Du contrôle de la technique,
  - Du contrôle de l'interprétation,
  - De la relecture systématique du ou des FCU négatifs précédant un frottis de type ASC-H, haut grade, atypie glandulaire, cancer,
  - Du contrôle de la formulation des conclusions (compte rendu standardisé),
  - De l'intégration de l'ensemble du personnel dans le processus de contrôle,
  - De la recherche des examens cytologiques faux-négatifs et des faux-positifs.»
- Le compte rendu, qui doit être fondé sur le système de Bethesda 2014 et respecter les comptes rendus standardisés proposés par la Société française de cytologie clinique.

- Enfin, il indique que « Les structures ACP s'engagent à respecter les "recommandations de bonnes pratiques en anatomie et cytologie pathologiques" et/ou être accréditées selon la norme ISO 15189 »

Parallèlement, l'INCa a également publié en 2016 de nouvelles « recommandations sur la conduite à tenir devant une femme ayant une cytologie cervico-utérine anormale » qui précisent les conduites diagnostiques, notamment la place respective de la colposcopie, de la biopsie, de la cytologie cervico-utérine, du test HPV et du double immunomarquage p16/Ki67 et les modalités de prise en charge thérapeutique et de surveillance des patientes (41).

### **C. Réalisation de la validation**

Comme précédemment, nous suivrons les étapes décrites dans la partie méthodologie .

#### **1. Choix de la méthode et état des lieux**

La méthode à valider a été choisie en concertation avec les médecins du service. Pour une première validation, il paraissait plus simple de choisir une méthode qualitative avec une phase pré-analytique courte, plus facilement maîtrisable. La méthode concerne également un nombre limité d'intervenants et nous pensions que cela en faciliterait l'organisation.

Par ailleurs, il était envisagé depuis plusieurs mois de changer de technique de coloration pour les FCU (passage d'une coloration de Harris-Shorr à une coloration de Papanicolaou), notamment dans le but d'harmoniser les techniques de coloration pour les différentes cytologies au sein du service. En effet, plusieurs modifications sont prévues en secteur de cytologie, notamment le passage d'une technique conventionnelle à une technique monocouche pour les cytologies thyroïdiennes, qui seront ensuite colorées en Papanicolaou. Pour des raisons pratiques, il a été prévu d'harmoniser la coloration et de colorer, à terme, les cytologies cervico-utérines, thyroïdiennes, pancréatiques et urinaires en coloration Papanicolaou.

Choisir de valider cette technique était donc un bon moyen d'impulser ce changement et fournissait en plus des conditions favorables à la validation, notamment pour la comparaison des méthodes.

D'autre part, la perspective de participer peut-être au dépistage organisé du cancer du col de l'utérus nous encourageait à valider cette technique.

Dans le service, les FCU sont reçus en milieu liquide et traités en technique monocouche (méthode ThinPrep Pap Test de Hologic). Les étalements obtenus sont ensuite colorés et assemblés.

Les lames font l'objet d'une première lecture par l'une des 2 cytotechniciennes du service, titulaires du Diplôme Universitaire Enseignement Spécialisé de Techniques Anatomique et Cytopathologique (ESTAC). Dans le cas où un frottis pathologique est identifié en première lecture, il est vérifié par la seconde cytotechnicienne, avant d'être relu par l'un des médecins pathologistes du service. Ainsi, une relecture par un médecin pathologiste est effectuée pour toutes les lames identifiées comme pathologiques, mais également à la demande de la cytotechnicienne, et systématiquement pour toute patiente présentant un antécédent de pathologie cervicale. Au total, 20 à 25% des FCU sont donc relus par un médecin pathologiste.

Les comptes rendus font ensuite l'objet d'une validation médicale informatique.

Une fois par trimestre, une séance de relecture est organisée avec le médecin responsable et les cytotechniciennes sur une sélection de cas qui leur ont posé problème. Il est envisagé d'augmenter la fréquence de ces séances, en les axant spécifiquement sur les cas discordants pour lesquels le pathologiste n'a pas validé le diagnostic de la cytotechnicienne.

Comme pour la coloration standard, le contrôle de la qualité de la technique s'effectue sur chaque lame lors de son interprétation et constitue une « veille » continue de la qualité. Cependant cette évaluation n'était pas formalisée selon des critères définis et il n'était pas fixé de limite d'acceptabilité.

Le laboratoire ne participait pas à l'EEQ organisée par l'AFAQAP pour les FCU.

Le service d'APCNP étant déjà engagé dans une démarche qualité, le socle du système de management était déjà en place au début de ce travail et de nombreux documents étaient rédigés, diffusés et appliqués. Les ressources documentaires existantes concernant le système de management de la qualité et les processus pré-analytique et analytique du FCU sont listées ci-après.

➤ **Ressources générales et système management de la qualité**

- Un manuel qualité *en cours de rédaction*,
- Un catalogue d'examens et de prises en charges techniques,
- Une procédure évaluation et amélioration continue,
- Un organigramme hiérarchique,
- Un organigramme qualité.

➤ **Ressources humaines**

- Une procédure gestion des ressources humaines,
- Un mode opératoire accueil des nouveaux internes dans le service,
- Plusieurs fiches d'habilitation (pas pour le secteur de cytologie),
- Une fiche de mission responsable qualité du service d'ACPNP et du CRB TBM,
- Une fiche de mission cadre du service d'ACPNP et du CRB TBM,
- Une fiche de mission pathologiste et technicien référent qualité de secteur.

➤ **Gestion documentaire**

- Une procédure maîtrise documentaire,
- La gestion de chaque enregistrement est formalisée dans la ou les procédure(s) correspondante(s).

➤ **Non-conformités et évènements indésirables**

- Une procédure analyse de risque et procédure dégradée,
- Une procédure identitovigilance,
- Un mode opératoire gestion des non-conformités majeures et mineures,
- Une fiche de traçabilité des non-conformités majeures et mineures à la réception,
- Une fiche de déclaration des dysfonctionnements.

➤ **Concernant les différentes étapes de la prise en charge d'une cytologie cervico-utérine**

○ Transport des prélèvements au sein de l'hôpital

- Procédures logistiques communes avec le LBM pour le transport des prélèvements au sein de l'AP-HM,
- Catalogue des examens et prises en charges techniques et consignes de conditionnement et d'acheminement diffusés sur le site Internet du service.



- Réception et enregistrement
    - Un mode opératoire réception et distribution des prélèvements,
    - Un mode opératoire enregistrement des demandes non conformes.
  - Gestion des automates
    - Une procédure gestion des équipements.
  - Stock et gestion des réactifs
    - Une procédure gestion des fournitures et évaluation des fournisseurs.
  - Cytologie
    - Une procédure cytologie,
    - Un mode opératoire prise en charge des cytologies en monocouche,
    - Un mode opératoire coloration des cytologies,
    - Un mode opératoire maintenance de l'automate monocouche Hologic,
    - Un mode opératoire maintenance de l'automate de coloration DRS 2000.
- **Métrie**

La cadre médico-technique est la référente métrie du service. Cinq autres personnes du service ont suivi une formation à la métrie. Les vérifications métriques sont sous-traitées à un prestataire de service externe.

➤ **Vérification/Validation des méthodes et gestion de la portée flexible**

Ce dossier de validation étant le premier réalisé dans le service, il n'existait pas de procédures de vérification/validation de méthode et de gestion de la portée flexible.

## **2. Mise au point de la technique**

Le changement de méthode de coloration a nécessité une étape de mise au point de la technique.

Pour ce faire, plusieurs protocoles de coloration différents ont été testés. Il s'agissait d'une part d'un protocole de coloration proposé par Hologic, le fournisseur du processeur monocouche, et d'autre part de différents protocoles utilisés dans d'autres services d'ACP et de cytologie. Pour chaque protocole, une série de FCU normaux et pathologiques ont été colorés. Toutes les lames ont été observées au microscope multi-

tête par la pathologiste référente et les deux cytotechniciennes, afin de juger de façon collégiale de la qualité de rendu de chaque technique.

Pour juger de la qualité des différentes colorations, nous avons réalisé une fiche d'évaluation inspirée des critères de l'AFAQAP utilisés lors de l'EEQ pour les FCU en 2015 (**Annexe 5**).

Aucun protocole ne donnant entière satisfaction, des ajustements ont été réalisés sur les temps de coloration et les réactifs utilisés pour la différenciation, en veillant à étudier un seul paramètre à la fois.

Au total, 12 essais ont été réalisés, permettant de mettre au point un protocole fournissant une coloration satisfaisant les exigences de qualité souhaitées.

La démarche de mise au point et les essais réalisés ont fait l'objet de comptes rendus qui sont archivés dans des classeurs dédiés avec les documents du dossier de validation.

### **3. Planification du déroulement de la validation**

Ce travail a impliqué la participation du médecin référent en gynéco-pathologie, de deux cytotechniciennes, de l'ingénieure qualité du service et moi-même. Le travail était planifié de mai à septembre 2017 (**Tableau 6**).

<b>Action</b>	<b>Responsable(s)</b>	<b>Délai</b>
Détermination des caractéristiques de la méthode	Médecin/Interne	Mai
Description de la méthode	Médecin/Interne	Mai
Recherches bibliographiques	Interne	Mai
Détermination des performances attendues, des limites d'acceptabilité et des objectifs analytiques	Médecin/Interne	Mai
Choix du matériel de référence	Médecin/Interne	Juin
Analyse des risques et des modalités de maîtrise	Participation de l'ensemble du groupe	Juin
Vérification/Actualisation des documents. Rédaction de nouveaux documents.	En fonction des besoins	Au fur et à mesure des besoins
Mise au point du plan expérimental	Médecin/Interne	Juin
Réalisation des expériences	Cytotechniciennes	Juillet-Septembre
Evaluation des lames test	Médecin/Cytotechnicienne	Août-Septembre
Analyse des résultats	Médecin/Interne	Septembre
Conclusion et rédaction du dossier	Médecin/Interne	Septembre

**Tableau 6. Planification de la validation de la cytologie cervico-utérine à l'hôpital de la Timone**

## 4. Détermination des caractéristiques de la méthode et description

### a) Caractéristiques

Le processus analytique commence une fois que le prélèvement a été reçu, enregistré et acheminé jusqu'en salle de cytologie. Il se fini une fois que la lame a été assemblée et prête à être interprétée.

Le processus analytique comprend 3 sous-processus réalisés à l'aide de trois automates différents :

- les cellules sont étalées par un processeur ThinPrep™ 2000 de HOLOGIC®,
- la lame est colorée dans un automate de coloration DRS 2000® de Sakura®,
- la lame est assemblée avec une lamelle dans un automate Tissue-Tek® Film® Sakura®.

Il s'agit d'une méthode qualitative puisque le résultat n'apporte pas d'information sur une quantité mais sur la morphologie des cellules d'un échantillon permettant d'en réaliser une analyse cytologique.

Les « analytes » sont les cellules recueillies lors du prélèvement et fixées dans une solution de conservation PreservCyt® (formulée à base de méthanol et d'eau).

La finalité de la méthode est le dépistage des lésions pré-invasives ou des cancers du col de l'utérus à un stade précoce.

La première et la troisième étape sont réalisées en suivant scrupuleusement les recommandations fournisseurs et relèveraient d'une vérification des méthodes (portée A), tandis que la seconde étape de coloration est réalisée selon un protocole mis au point par le service et relève donc d'une validation (portée B). Néanmoins, ces 3 étapes sont interdépendantes puisqu'il n'est pas possible de vérifier les performances de la technique monocouche sans procéder à la coloration de la lame et, inversement, la validation de la technique de coloration nécessite forcément un étalement préalable. Par ailleurs, une lame ne peut pas être observée si elle n'est pas assemblée.

Ainsi, même si le processus analytique comporte 3 sous-processus, il est impossible de vérifier/valider chacun de manière indépendante. Aussi nous nous plaçons dans le cas

d'un processus simple, avec un périmètre d'accréditation selon une portée flexible étendue de type B.

## b) Description des sous-processus :

### Etape 1 : Etalement par méthode ThinPrep PapTest

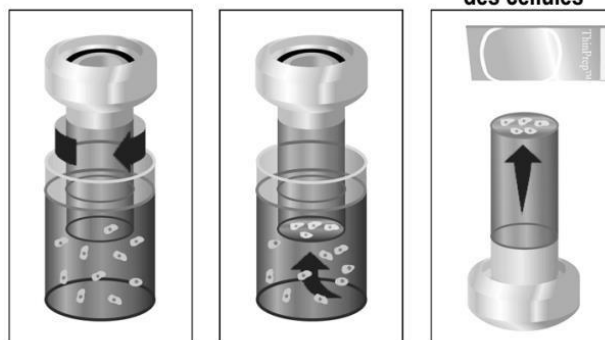
Cette technique a été introduite en 1996 par le laboratoire Hologic.

Elle commence par un prélèvement effectué avec un dispositif de prélèvement cervical CervexBrush. Ce prélèvement est immergé et agité dans un flacon pré-rempli de 20 ml de solution PreservCyt. Le flacon contenant l'échantillon est ensuite fermé, étiqueté et envoyé au laboratoire.

Au laboratoire, le flacon est placé dans le processeur ThinPrep 2000 où une dispersion douce désagrège le sang, le mucus et les débris impropres au diagnostic, et mélange les cellules de l'échantillon. Les cellules sont ensuite recueillies sur un filtre. Le processeur contrôle le débit à travers le filtre pendant le recueil des cellules, de façon à obtenir un nombre de cellules adéquat. Une fine couche de cellules est ensuite transférée sur une lame de verre dans un cercle de 20 mm de diamètre et la lame est automatiquement déposée dans une solution de fixation (alcool) (46).

#### Préparation de l'échantillon par la technique ThinPrep

##### 1. Dispersion    2. Recueil des cellules    3. Transfert des cellules



##### (1) Dispersion

Le filtre pour ThinPrep Pap Test tourne à l'intérieur du flacon d'échantillon et crée ainsi dans le liquide un courant suffisamment fort pour séparer les débris et disperser le mucus, mais suffisamment doux pour ne pas modifier l'aspect des cellules.

##### (2) Recueil des cellules

Un vide léger est créé à l'intérieur du filtre pour ThinPrep Pap Test ; il permet de recueillir des cellules sur la surface externe de la membrane. Le recueil des cellules et le débit à travers le filtre sont contrôlés par le logiciel du processeur ThinPrep 2000.

##### (3) Transfert des cellules

Une fois les cellules recueillies sur la membrane, le filtre pour ThinPrep Pap Test est renversé et pressé doucement contre la lame de microscope ThinPrep. Une attraction naturelle et la pression d'air légèrement positive permettent l'adhérence des cellules sur la lame ThinPrep. Il en résulte une répartition égale des cellules sur une zone circulaire définie.

**Figure 6. Préparation de l'échantillon par la technique ThinPrep (46)**

## Etape 2 : Coloration

### □ **Technique Harris Shorr**

Cette coloration a été mise au point par Ephraïm Shorr en 1940 (47). Elle a connu depuis de nombreuses variantes qui ont permis d'augmenter son efficacité et de faciliter sa mise en pratique. Elle est couramment employée en cytologie et associe :

- un colorant nucléaire, **l'hématoxyline de Harris**, associant de l'hématoxyline et du sulfate d'aluminium, qui colore les noyaux des cellules grâce à son affinité avec l'ADN ;
- un colorant nucléo-cytoplasmique, **le colorant de Shorr** composé lui-même de 3 colorants (Orange G, vert solide et Biebrich écarlate).

Les cellules basophiles apparaissent bleues, et les cellules acidophiles rouges/orangées.

### □ **Technique de Papanicolaou**

Mise au point par Geórgios Nikoláou Papanikoláou en 1942 (48), elle permet de différencier les cellules en fonction de leur maturité et de leur activité métabolique.

C'est la coloration la plus utilisée pour la cytologie gynécologique.

Elle utilise trois colorants, un colorant nucléaire et 2 cytoplasmiques :

- **l'hématoxyline de Harris**,
- **l'Orange G**, colorant acide, réagit avec les cellules squameuses matures de par son affinité avec la kératine,
- **l'Eosine-Azur**, colorant acide polychrome (contenant de l'éosine, du vert lumière et du brun de Bizmark), réagit avec le cytoplasme des cellules squameuses immatures (basales et intermédiaires), les cellules glandulaires et les hématies.

Ainsi, une fois colorés :

- les noyaux apparaissent en bleu/noir,
- les cytoplasmes des cellules non kératinisées sont colorés en bleu/vert (cellules des couches profondes),
- les cytoplasmes des cellules kératinisées apparaissent en rose/orange (cellules superficielles),
- les hématies sont colorées en rouge.

### Etape 3 : Assemblage des lames

Les lames sont déshydratées grâce à des bains de xylène, puis un film de verre est collé afin de préserver les préparations.

## **5. Recherches bibliographiques**

Les recherches bibliographiques ont été réalisées à partir des manuels fournisseurs, d'Internet et de la base de données PubMed.

Concernant l'étape d'étalement monocouche et le montage des lames, le laboratoire suit les recommandations d'utilisation des fournisseurs (manuels d'utilisation et d'entretien des automates, fiches des réactifs et consommables).

Concernant la technique de coloration, la méthode a été mise au point en utilisant les données fournisseur pour l'utilisation de l'automate et des protocoles utilisés par d'autres laboratoires qui ont été adaptés par le service, à la suite de nombreux essais.

L'organisation général du service respecte déjà les recommandations de l'AFAQAP : *RBPACP* (12) et *Gestion d'une structure ACP* (13).

Les recommandations françaises concernant l'assurance qualité en cytopathologie gynécologique sont relativement anciennes puisqu'elles ont été éditées en 1988 (49). Nous avons donc consulté également les *Directives concernant la pratique et l'assurance qualité en cytopathologies de la Société Canadienne de Cytologie* (50) et les *Recommandations européennes pour l'assurance qualité pour les cytologies cervico-utérines* (38).

La définition de critères objectifs pour l'évaluation de la qualité de la technique s'est appuyée sur les critères de l'AFAQAP utilisés lors du programme d'EEQ pour les FCU en 2015 (51).

Les conditions pré-analytiques et la conservation des échantillons et réactifs respectent les recommandations fournisseur (acheminement à température ambiante, conservation 6 semaines).

L'identification des interférences potentielle s'est appuyée sur les recommandations fournisseurs et les recommandations de prélèvements des FCU pour les cliniciens (46,52,53)

Aucune bibliographie n'a été trouvée concernant la contamination inter-échantillons, les performances attendues, ni les objectifs analytiques.

## **6. Détermination des performances attendues, des limites d'acceptabilité et les objectifs analytiques**

Les performances et objectifs analytiques ne font pas l'objet de recommandations.

Pour évaluer la qualité des lames, une fiche d'évaluation a été établie en s'appuyant sur les critères de l'AFAQAP (51) utilisés lors du programme d'EEQ pour les FCU en 2015, et en les simplifiant pour les rendre facilement utilisables en pratique (**Annexe 5**).

Cette fiche détaille des critères d'évaluation de la qualité de l'étalement et de la coloration et propose une évaluation globale en 4 lettres (A=optimal, B=Bon, C=moyen, D=insuffisant)

Pour la limite d'acceptabilité : une lame est acceptée si elle obtient une lettre A ou B et rejetée si elle obtient une lettre C ou D.

La grille et la limite d'acceptabilité sont validées par les cytotechniciennes et les médecins pathologistes interprétant des FCU.

Les objectifs analytiques ne font pas l'objet de recommandations particulières. Ils ont été fixés par le laboratoire. L'objectif analytique était d'obtenir 95% de lames « acceptées » (note A ou B par les 2 observateurs). Pour la comparaison des méthodes, l'évaluation portera sur la concordance des résultats des 2 techniques de coloration Harris-Shorr et Papanicolaou, sur le critère lame « acceptée » ou « rejetée ». L'objectif fixé était d'obtenir 95% d'évaluations concordantes.

## **7. Choix du matériel de référence**

Il n'existe pas de matériel de référence commercialisé pour le FCU. Le matériel de référence a été sélectionné parmi des lames données au laboratoire par Hologic, le



fournisseur du processeur ThinPrep, lors de son installation dans le laboratoire, et considérées comme lames de référence pour la mise au point de la technique sur site.

5 lames de qualité optimale ont été sélectionnées.

## **8. Analyse des risques et des modalités de maîtrise**

Nous avons réalisé une analyse de risque pour identifier les différents facteurs pouvant influencer la qualité des FCU. Dans la nouvelle version du SH FORM 43, il est demandé de grader chaque risque selon sa criticité.

Nous nous sommes appuyés sur l'analyse des non-conformités déclarées depuis juillet 2011 concernant les FCU et sur la réalisation d'un diagramme de causes et effets.

**La recherche des non-conformités** a permis de retrouver 11 non-conformités entre janvier 2009 et mai 2017 :

- N°229 : 2 demandes d'examen et 2 pots ont été reçus le même jour pour la même patiente alors qu'il s'agit vraisemblablement de 2 patientes différentes ;
- N°340 : absence d'eau dans l'appareil de coloration en raison d'une coupure d'eau non signalée au laboratoire ;
- N°355 : 2 demandes d'examen et 2 pots reçus le même jour pour la même patiente alors qu'il s'agit vraisemblablement de 2 patientes différentes ;
- N°570 : 2 demandes d'examen et 2 pots ont été reçus pour la même patiente alors qu'il s'agit vraisemblablement de 2 patientes différentes (nom différent écrit à la main sous l'étiquette) ;
- N°592 : une demande de FCU est arrivée accompagnée d'un pot scellé (neuf) identifié avec l'étiquette patient correspondante. La technique a été effectuée et confirme l'absence de cellule ;
- N°654 et 655 : automate Hologic T2000 en panne ;
- N°659 : 2 bons de demande d'examen pour 2 pots de frottis sont arrivés le même jour pour la même patiente mais, après observation au microscope, les 2 frottis ne correspondent pas et laissent supposer qu'il s'agit de 2 personnes différentes ;
- N°669 : en techniquant un frottis la technicienne a fait tomber le pot, le prélèvement

est perdu ;

- N°760 : erreur d'identification d'un FCU, les informations ne correspondent pas à l'âge de la patiente ;
- N°827 : 2 FCU faits le même jour pour la même patiente mais avec des résultats cytologiques différents : probable erreur d'étiquetage en gynécologie.

Ces non-conformités concernent en majorité des erreurs d'identification par les services préleveurs. Les autres concernent une coupure d'eau, une panne d'automate et un pot brisé lors de manipulation dans le laboratoire.

Le diagramme de causes et effets est présenté à la figure 7.

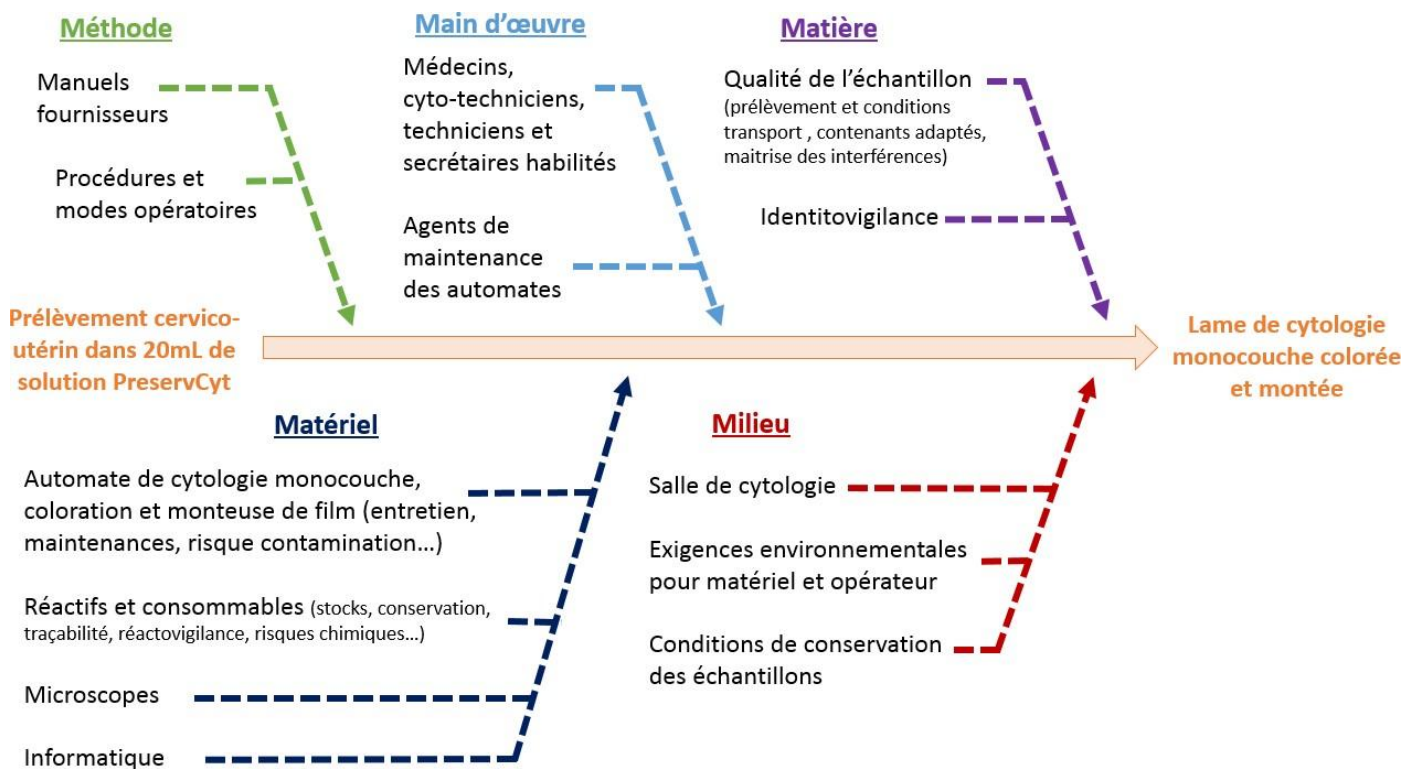


Figure 7. Diagramme de causes et effets pour la cytologie cervico-utérine en milieu liquide

Pour déterminer la criticité de chaque risque, nous avons utilisé l'échelle de criticité présentée dans le **tableau 7**. Cette échelle a été adaptée d'après celle utilisée par le LBM de l'APHM. Bien qu'il s'agisse *stricto sensu* d'une échelle de gravité plutôt que de criticité, nous avons choisi de prendre cette échelle pour harmoniser les pratiques entre les laboratoires.

		<u>Impact possible sur la qualité</u>	
<b>Criticité</b>	1	Non critique	Aucun impact sur la qualité
	2	Faiblement critique	Risque de variation faible de qualité sans modification de l'interprétation
	3	Moyennement critique	Risque de variation modérée de qualité permettant néanmoins une interprétation correcte
	4	Critique	Peut rendre l'examen non interprétable
	5	Très critique	Risque de résultat rendu erroné

**Tableau 7. Evaluation de la criticité**

Concernant la métrologie, les différents réactifs peuvent être conservés à température ambiante avec de larges plages de température et le service est climatisé : aucune enceinte thermique n'est utilisée pour la conservation des réactifs et des échantillons. Nous n'avons pas jugé utile de contrôler la température ambiante de la pièce de cytologie où sont situés les automates car la pièce est climatisée et les plages de température recommandée par les fabricants sont larges (15 à 32° pour ThinPrep 2000 et 10 à 40° pour le colorateur et la monteuse de film). Enfin, le matériel utilisé pour la dilution des réactifs est à usage unique et marqué CE, et ne nécessite donc pas de contrôle métrologique.

Les éléments identifiés par l'analyse des non-conformités et le diagramme de causes et effets ont ensuite été détaillés dans le dossier de validation (**Annexe 6**).

Cette étape a permis d'identifier de nouvelles modalités de maîtrise à mettre en place, comme par exemple la création de fiches d'habilitation ou le suivi des lots de réactifs et dates de péremption qui n'est pas effectué et devra être mis en place pour la mise en routine.

### **9. Vérification et actualisation des documents concernés**

Il n'existait pas de procédure de vérification/validation de méthode, ni de procédure de gestion de la portée flexible. Ces deux documents ont donc été rédigés.

Il n'existait pas non plus d'habilitation pour le secteur de cytologie et deux "fiches d'habilitation" ont été créées, l'une pour les techniciens de cytologie (**Annexe 7**) et l'autre pour les médecins pathologistes qui interprètent des FCU (**Annexe 8**).

Le changement de technique de coloration nécessitera aussi d'actualiser les documents liés à la technique pour sa mise en routine. Enfin, comme indiqué, l'analyse des risques a fait apparaître de nouvelles modalités de maîtrise à mettre en place et nécessite l'actualisation de certains documents qualité.

### **10. Détermination des paramètres à vérifier et mise au point du plan expérimental**

Par rapport au dossier de validation de la coloration standard, le plan expérimental choisi pour ce second dossier comporte quelques différences car la technique est différente, mais aussi car le SH GTA 04 avait été actualisé. En effet, le tableau présenté dans la nouvelle version (**Tableau 4**, page 35) encourage à réaliser des essais de fidélité, justesse, comparaison des méthodes, interférences, contamination inter-échantillon, robustesse, stabilité des réactifs, intervalle de référence, limite de détection et spécificité/sensibilité analytique. Tous ces paramètres n'ont pas été testés car certains nous ont semblés inadaptés pour cette méthode qualitative.

Les caractéristiques détaillées du plan expérimental sont décrites ci-dessous.

## **a) Répétabilité**

### Définition :

« Tester la répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, mêmes instruments, dans le délai le plus court possible » (SH GTA 04(19)).

### Méthode :

Nous avons prévu de réaliser 3 passages successifs d'un échantillon normal et d'un échantillon pathologique. Ce nombre a été choisi de façon arbitraire. Il ne nous paraissait pas pertinent de réaliser plus de passages, d'une part car la quantité de cellules peut être insuffisante pour réaliser plus de techniques tout en conservant la possibilité de réaliser un typage HPV si besoin et d'autre part car, en pratique courante, nous ne sommes jamais amenés à refaire la technique plus de 2 fois.

Les échantillons devaient être sélectionnés après un premier diagnostic en coloration Harris Shorr pour pouvoir sélectionner un échantillon normal et un échantillon évocateur d'une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade. Les 3 passages devaient être réalisés par la même cytotechnicienne, avec le même lot de réactifs, et à la suite les uns des autres. Le médecin référent devait ensuite vérifier que les 3 passages étaient homogènes en termes de densité cellulaire, de représentation des différents types cellulaires, de qualité d'étalement et de coloration.

## **b) Exactitude**

### Définition :

L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. L'exactitude doit, en théorie, être vérifiée à partir d'un étalon ou matériau de référence. En pratique, le SH GTA 04 admet de l'évaluer à partir des résultats obtenus à une EEQ (19). Nous avons choisi cette possibilité, d'autant plus qu'il n'existe pas de matériau de référence.

### Méthode :

Le laboratoire est inscrit à l'EEQ de l'AFAQAP « Coloration Papanicolaou / Harris-Shorr pour les FCU » pour 2018.

### **c) Comparaison des méthodes**

#### Définition :

La comparaison des méthodes consiste à comparer la méthode à valider avec une méthode de référence ou avec une autre méthode utilisée au laboratoire.

#### Méthode :

La comparaison des méthodes a été faite en comparant la coloration Harris-Shorr et la coloration Papanicolaou sur 30 échantillons.

En absence de matériel de référence disponible, les échantillons utilisés proviennent de prélèvements de routine sélectionnés « au fil de l'eau ». Le seul critère de sélection était que la quantité de l'échantillon soit suffisante pour effectuer les tests de performance sans compromettre le diagnostic et la prise en charge des patientes (notamment pour pouvoir réaliser une recherche de HPV).

Chaque échantillon devait faire l'objet d'un double étalement monocouche puis, un exemplaire devait être coloré en Harris-Shorr et l'autre en Papanicolaou dans le délai le plus court possible, à raison de 6 échantillons chaque jour, pendant 5 jours consécutifs

Les 60 lames devaient ensuite être appréciées de façon indépendante par la pathologiste référente et une cytotechnicienne en utilisant la grille d'évaluation de la qualité et la limite d'acceptabilité fixée. Une lame est qualifiée d'acceptée si elle obtient une évaluation A ou B par les 2 observateurs ; elle est rejetée dans le cas contraire. La concordance des 2 méthodes est évaluée sur le critère lame « acceptée » ou « rejetée ».

### **d) Contamination inter-échantillons**

#### Définition :

« Des phénomènes de contamination entre échantillons peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques. Une étude de contamination inter-échantillon est à effectuer pour tous les systèmes automatisés. » (SH GTA 04 (19))

#### Méthode :

Nous avons décidé de techniquer chaque jour, pendant 5 jours consécutifs, un flacon de Preservcyt ne contenant pas de prélèvement, intercalé entre les 6 échantillons de

comparaison des méthodes, puis également intercalé dans le colorateur avec les lames colorées en Papanicolaou.

Les lames devaient ensuite être observées par le médecin référent pour s'assurer de l'absence de contamination.

### e) Robustesse

#### Définition :

« La robustesse d'une procédure d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation. Ces variations, faibles, correspondent à l'écart d'un paramètre opératoire par rapport à sa valeur nominale définie dans la méthode.» (SH GTA 04 (19))

#### Méthode :

L'étude de la robustesse a concerné les paramètres suivants :

- **Durée et conditions de conservation des échantillons** : le laboratoire conserve les échantillons pendant 6 semaines (conformément aux recommandations fournisseur). Nous voulions nous assurer que la qualité était comparable pendant toute la durée de la conservation. Un même échantillon devait être techniqué et coloré en Papanicolaou à J1, J21 et au moins J42.

- **Variabilité inter-opérateurs** : les techniques réalisées dans le cadre de la comparaison des méthodes devaient être effectuées par 2 techniciennes différentes pour pouvoir constater une éventuelle variabilité inter-opérateurs.

- **Température ambiante** : s'agissant de la mise au point d'une nouvelle technique, nous ne pouvons pas comparer la qualité des lames en fonction de la température ambiante. Nous avons prévu dans le suivi de la méthode de comparer 5 lames techniquées en été et 5 lames techniquées en hiver. La comparaison est planifiée pour le mois de janvier 2018.

## f) Stabilité des réactifs

### Définition :

Etudier la stabilité des réactifs consiste à évaluer si les réactifs « embarqués » dans un automate sont stables au cours du temps.

### Méthode :

Nous avons choisi de réaliser les tests pour la comparaison des méthodes sur 5 jours consécutifs pour évaluer de façon concomitante la stabilité des réactifs pendant la durée d'utilisation prévue (5 jours), en regardant si il existe une différence de qualité entre le premier et le 5eme jour.

## g) Paramètres non étudiés :

La sensibilité et spécificité analytique, la fidélité, la justesse, l'incertitude de mesure, les interférences, l'étendue de mesure, et l'intervalle de référence n'ont pas été étudiés car ils ne nous ont pas semblés pertinents pour cette technique.

Concernant la **sensibilité et la spécificité** : non seulement il n'existe pas de matériel de référence mais il n'existe pas non plus, au moment de la réalisation du FCU, de diagnostic de certitude qui pourrait permettre de calculer une sensibilité ou une spécificité. De plus, il s'agirait alors d'une sensibilité et d'une spécificité diagnostique et le diagnostic en tant que jugement professionnel ne rentre pas dans le cadre de l'accréditation.

Il en est de même pour **la fidélité et la justesse**. La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions stipulées. La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence. Le SH GTA 04 indique que, pour les méthodes qualitatives, il est possible de calculer une approche de ces 2 paramètres à partir des valeurs prédictives positives et négatives, des vrais négatifs et faux négatifs, lorsque le recrutement est suffisant et qu'une méthode de référence ou de diagnostic définitif est disponible. Nous nous heurtons donc aux mêmes problèmes que pour la sensibilité et la spécificité.

Concernant **les incertitudes de mesure**, le SH GTA 04 indique que, dans le cas des méthodes qualitatives, les incertitudes de mesure peuvent être déterminées par l'analyse



des risques et des modalités de maîtrise. Ce n'est qu'en cas de risque résiduel non maîtrisable que l'impact sur le résultat doit être évalué et, le cas échéant, doit faire l'objet d'une information aux prescripteurs si elle est importante pour la validité des résultats. Dans notre cas, l'analyse de risque et la pratique du laboratoire ne montre pas de risque résiduel significatif non maîtrisable devant faire l'objet d'une information supplémentaire.

Pour **les interférences**, les recherches bibliographiques ont permis d'identifier les éléments suivants comme susceptibles d'interférer avec la qualité de la technique :

- utilisation d'une quantité importante de gel lubrifiant non hydrosoluble avec carbomère,
- utilisation de colorants (acide acétique, lugol) lors d'une colposcopie,
- sang en quantité abondante,
- médicaments ou contraceptifs vaginaux.

Ces interférences sont connues par les préleveurs et font partie des recommandations courantes de bonnes pratiques de prélèvement pour tout FCU. Les préleveurs savent donc qu'il faut éviter ces situations. La pratique du laboratoire montre que ce point est bien maîtrisé : un seul cas d'interférence avec des colorants utilisés lors d'une colposcopie avant la réalisation du FCU a été responsable d'une impossibilité d'interpréter le FCU. Le médecin préleveur avait d'ailleurs informé de cette interférence sur le bon d'examen.

**L'étendue de mesure** comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité. Seule la limite de détection, qui décrit « la plus petite valeur de mesurande dont une procédure analytique peut indiquer la présence avec un niveau de confiance spécifié » peut être approchée pour les méthodes qualitatives. Ce n'est pas le cas pour notre technique pour laquelle aucune bibliographie n'indique de limite de détection. De plus, il n'est pas possible de contrôler le nombre de cellules présentes dans un échantillon pour pouvoir tester ce paramètre.

Enfin, il n'existe pas de **d'intervalle de référence** pour le FCU.

## **11. Sélection des échantillons, mise en œuvre expérimentale et évaluation des lames test**

Les expériences ont été réalisées par 2 techniciennes en suivant le plan expérimental précédemment décrit.

Pour la comparaison des méthodes, les lames ont été appréciées de façon indépendante par les 2 observateurs en utilisant la grille d'évaluation de la qualité des FCU. Pour les autres paramètres étudiés, les lames ont été appréciées par la pathologiste référente. Chaque observateur a rempli un formulaire d'évaluation comportant la note attribuée à chaque lame et des commentaires éventuels. Ces enregistrements seront archivés avec le dossier de validation pour en assurer la traçabilité. Certaines des lames test, notamment les lames colorées en technique Harris Shorr utilisées pour la comparaison des méthodes, étaient également les lames sur lesquelles ont été faits les diagnostics. Concernant ces cas, les lames sont archivées avec le dossier de validation et un commentaire est inséré dans le dossier patient pour signaler cet archivage particulier.

## **12. Résultats**

L'ensemble des résultats a été répertorié sous forme de tableaux mis en annexe du dossier de validation.

### **a) Répétabilité**

Les 3 passages successifs des deux échantillons ont montré une qualité comparable : les 3 passages sont homogènes en termes de densité cellulaire, de représentation des différents types cellulaires, de qualité d'étalement et de coloration.

### **b) Comparaison des méthodes**

Les 60 lames ont toutes obtenu une évaluation A ou B par les 3 observateurs : 100% des lames ont été acceptées. La totalité des lames ayant été acceptées pour les 2

méthodes, la concordance est parfaite (100% des évaluations sont concordantes sur le critère lame « acceptée » ou « rejetée »).

### **c) Contamination inter-échantillons**

Les 6 lames observées ne comportent aucune cellule.

### **d) Robustesse**

- **Durée et conditions de conservation des échantillons** : les trois lames issues du même échantillon ont été techniquées à J1, J22 et J54. Le 3<sup>ème</sup> essai a été réalisé 11 jours plus tard que ce qui était prévu, portant la durée de conservation maximale testée à 7 semaines et demie. Ils sont de qualité comparable.

- **Variabilité inter-opérateurs** : absence de différence de qualité mise en évidence.

### **e) Stabilité des réactifs**

Sur les 5 jours consécutifs, toutes les lames ont été évaluées A ou B. La stabilité des réactifs est validée pour 5 jours d'utilisation.

## **13. Conclusion et rédaction du dossier**

L'ensemble des tests réalisés sont conformes et permettent de conclure à la validité de la technique. La rédaction du dossier a été faite d'après le SH FORM 43 révision 01.

La technique sera mise en routine en novembre après réalisation de 10 comparaisons supplémentaires. En effet, étant donné le faible nombre d'échantillons pathologiques inclus dans la comparaison des méthodes, il est prévu de réaliser 10 comparaisons supplémentaires portant spécifiquement sur des cas pathologiques (5 lésions

malpighiennes intra-épithéliales de bas grade et 5 de haut grade) avant la mise en routine.

Le dossier de validation est présenté **annexe 6**. Afin d'assurer la confidentialité, les numéros d'enregistrement et les références des documents internes ont été changés.

#### **14. Suivi de la méthode et de la démarche qualité**

Le suivi de la méthode est assuré par une veille permanente de la qualité sur toutes les lames qui font l'objet d'une première lecture par une cytotechnicienne formée (et dorénavant habilitée) et une seconde lecture qui est réalisée par un pathologiste en cas de cytologie anormale, d'antécédent de pathologie cervicale ou à la demande de la cytotechnicienne. Ces modalités sont adaptées au fonctionnement du laboratoire et sont donc poursuivies.

Les séances de relectures entre médecins pathologistes et cytotechniciennes vont être organisées de façon plus fréquente et axées spécifiquement sur les cas discordants pour lesquels le pathologiste n'a pas validé le diagnostic de la cytotechnicienne.

Le laboratoire participera dès l'année prochaine, puis tous les ans, à l'EEQ pour les FCU de l'AFAQAP.

Le nombre de non-conformités analytiques est pris comme indicateur du processus analytique de cytologie cervico-utérine et fera l'objet d'un suivi bi-annuel.

Le dossier de validation sera complété par de nouveaux essais si des éléments de la méthode sont modifiés avec une influence potentielle sur la qualité obtenue.

## VI. DISCUSSION

La réalisation de ces deux dossiers et l'évaluation positive du COFRAC pour le premier d'entre eux, montrent que l'application de la norme NF EN ISO 15189 est possible en ACP. Néanmoins, cette norme a été écrite pour être destinée aux laboratoires de biologie médicale et son application, bien que possible, ne fait pas toujours sens dans notre spécialité.

En effet, elle ne tient pas du tout compte des spécificités de l'ACP qui utilise des techniques essentiellement morphologiques, avec une visualisation et une interprétation de chaque lame, l'ensemble des données étant intégrées au contexte clinique et aux examens complémentaires, pour aboutir à un diagnostic.

L'une des spécificités de l'ACP est également d'utiliser très peu de techniques normalisées. L'essentiel de l'activité relève donc d'une validation, qui est lourde et complexe à mettre en œuvre.

En outre, la plupart des processus métiers comportent de nombreux sous-processus mais qu'il n'est souvent pas possible d'étudier séparément, car interdépendants les uns des autres.

Les techniques que nous utilisons ne comportent pas en général de matériau de référence. Il n'existe pas non plus de recommandations de performances pour nos méthodes, ni de critères consensuellement admis pour évaluer leur qualité. Tous ces éléments doivent donc être longuement réfléchis et déterminés spécifiquement pour chaque structure en fonction de ses besoins.

Même si le guide technique d'accréditation en ACP permet de palier en partie à cette inadéquation, l'application des autres référentiels reste inconfortable en pathologie. Cette inadéquation est particulièrement palpable dans la nouvelle version du SH GTA 04, dont le tableau des paramètres à vérifier en fonction du type de méthode et du type de portée (**tableau 4**, page 35) a été modifié et encourage à vérifier certains paramètres qui ne sont pas du tout adaptés aux méthodes morphologiques qualitatives, qui représentent pourtant le cœur de notre métier.

La démarche est donc complexe, d'autant plus qu'elle nécessite l'acquisition d'un vocabulaire spécifique, de méthodes de travail et d'un formalisme très particuliers auxquels les pathologistes ne sont pas du tout formés. La lecture de la norme peut être très déroutante de prime abord et la compréhension des référentiels est souvent difficile

car abordant des notions que nous ne maîtrisons pas. Il est ainsi nécessaire d'acquérir une « culture qualité » qui nécessite une formation approfondie, un long processus d'assimilation et le concours indispensable de qualitatifs.

Ces difficultés d'application ne doivent pas faire perdre de vue l'objectif principal de la démarche, qui vise à améliorer la qualité de notre travail quotidien pour améliorer le service rendu aux patients et aux prescripteurs. Pour cela, il est important d'adapter le système qualité aux spécificités de chaque structure sans vouloir absolument « appliquer la norme pour la norme » et ne jamais oublier de mettre la qualité au service de la structure et non la structure au service de la qualité. Cette démarche serait grandement facilitée par l'utilisation d'un référentiel adapté à notre spécialité.

La réalisation de ces dossiers de validation a nécessité beaucoup de « temps humain », à la fois médical et technique, qu'il a été difficile de planifier au quotidien dans l'organisation générale des services. La mise en place d'un tel système a aussi un coût non négligeable. En dehors du coût en « temps humain », il faut compter la nécessaire formation du personnel à la qualité, l'emploi de personnels qualifiés en qualité (qualitatifs), le coût des logiciels de gestion documentaire, des audits externes, de l'inspection COFRAC, des contrôles qualité, des comparaisons interlaboratoires, etc. Tous ces coûts génèrent une charge lourde pour les laboratoires.

Enfin, le moment de l'évaluation COFRAC, que j'ai pu observer à l'IPC, est source d'un stress important pour les équipes qui se sentent, à juste titre, observées, évaluées, contrôlées. Ce stress peut générer des tensions relationnelles au sein des services si les responsabilités ne sont pas parfaitement définies.

Malgré toutes ces difficultés, la démarche a été globalement positive au sein des deux structures. Elle a nécessité de s'appuyer sur des documents de références, mais aussi de s'adapter aux spécificités de chaque technique, de chaque laboratoire et sur le système de qualité qu'elles avaient déjà mis en place.

Les contextes étaient très différents dans les laboratoires de l'IPC et de l'hôpital de la Timone. Le laboratoire d'ACP de l'IPC était déjà accrédité pour une technique et il s'agissait d'étendre cette accréditation. La technique était déjà mise en place en routine

au laboratoire. Il s'agissait donc de prouver qu'elle était effectivement de bonne qualité et de démontrer la compétence du laboratoire dans sa mise en œuvre. Pour le laboratoire d'ACPNP de l'hôpital de la Timone, il s'agissait à la fois d'un premier dossier de validation dans la structure, mais également d'inscrire cette démarche dans le cadre d'une modification de technique, qu'il fallait mettre au point. Les bénéfices sont donc très différents.

Pour le laboratoire d'ACP de l'IPC, le bénéfice principal de ce travail a été d'apporter une vue d'ensemble des risques de la réception d'un prélèvement jusqu'à sa coloration. Cette analyse transversale et systématique a permis d'identifier des faiblesses et d'y apporter des améliorations.

La démarche a aussi permis de relancer le service dans l'amélioration continue de la qualité après quelques mois de « flottement » qui avaient suivi la réponse favorable du COFRAC pour l'accréditation du laboratoire pour la technique d'immunohistochimie qualitative CD117 l'année précédente.

D'un point de vue plus général, j'ai pu constater que l'accréditation du laboratoire a abouti à une plus grande rigueur dans son organisation générale. Elle a permis notamment d'homogénéiser les pratiques professionnelles et d'en assurer la transmission entre opérateurs, d'améliorer les conditions d'accueil et de formation des nouveaux personnels, y compris les internes, de favoriser la mise en place de contrôles qualité et d'évaluations externes de qualité, la traçabilité de chaque étape technique, la gestion des non-conformités et événements indésirables, etc.

Enfin bien sûr, obtenir l'extension de l'accréditation et ainsi la reconnaissance de la compétence technique du laboratoire est très valorisant pour l'équipe, mais aussi pour l'image du laboratoire vis-à-vis des prescripteurs et des patients.

Dans le laboratoire d'ACPNP de la Timone, la décision de réaliser ce premier dossier de validation sur la cytologie cervico-utérine a été un moteur pour le changement de technique de coloration des FCU qui était en discussion depuis plusieurs mois. Le changement de technique était motivant pour l'équipe des cytotechniciennes qui en était demandeuse. Il rendait également la démarche plus concrète et pertinente car elle répondait alors à un vrai besoin de la structure pour faire évoluer sa pratique quotidienne. La perspective de la validation a poussé encore plus à mettre au point une

technique d'excellente qualité. Elle a également permis de formaliser la démarche, de la planifier de façon plus rigoureuse et d'en assurer la traçabilité. Les essais de comparaison des méthodes avaient une utilité plus concrète puisqu'ils permettaient réellement de s'assurer que les deux techniques étaient comparables, avant de prendre la décision d'en changer. Elle permettait également aux lecteurs de FCU de s'adapter à cette nouvelle technique et de vérifier qu'elle convenait bien à leurs attentes.

Valider cette technique était aussi intéressant pour le laboratoire dans le contexte de la généralisation du dépistage organisé du cancer du col de l'utérus en France et lui permettra de s'y engager plus facilement si l'AP-HM est amené à y participer.

D'une manière plus générale, la démarche aura aussi permis de rédiger les documents de base indispensables à la vérification/validation de méthodes, qui pourront servir de guide pour les validations futures.

Chaque dossier de validation a été l'aboutissement d'un travail transversal impliquant à la fois les médecins, les techniciens et l'équipe encadrante. La réunion des équipes médicales et techniques autour d'un objectif commun permet de renforcer les liens professionnels qui nous unissent et qui sont importants au quotidien pour assurer une bonne dynamique de travail.

Enfin, d'un point de vue personnel, l'élaboration de ces deux dossiers m'a permis de mettre en pratique de nombreuses notions que j'avais abordées au cours de mon Diplôme Universitaire d'Assurance Qualité en ACP. J'ai beaucoup apprécié travailler avec chacun des deux médecins référents et les techniciens et cytotechniciens des deux structures. Cela m'a également poussée à m'intéresser davantage aux aspects techniques de la spécialité et de mieux comprendre toutes les problématiques qui y sont rattachées. J'ai eu la chance de travailler avec des équipes très motivées et volontaires et cela aura été une très bonne expérience.



## VII. CONCLUSION

Nous avons donc vu en détail les référentiels et les bases méthodologiques indispensables à la validation des méthodes dans le domaine de l'ACP et une mise en pratique par la réalisation de deux dossiers de validation, pour la coloration standard en histologie et la cytologie cervico-utérine en milieu liquide (méthodes qualitatives en portée flexible de type B), selon la norme NF EN ISO 15189.

La validation des méthodes est un travail qui nécessite une grande rigueur. Il comporte en effet de très nombreuses étapes qui doivent être menées de façon organisée. L'état des lieux et la planification initiale sont donc des étapes clefs, indispensables au bon déroulement du travail. L'analyse des risques et modalités de maîtrise est essentielle pour assurer la qualité de ces techniques qualitatives. Enfin la démarche expérimentale permet de vérifier que les performances des méthodes sont conformes aux exigences du laboratoire.

Dans notre spécialité, l'absence de matériau de référence, de recommandations de performances, de critères consensuels d'évaluation de la qualité, etc. impose au laboratoire de les déterminer lui-même et nécessite un long travail de réflexion. De plus, certains paramètres qu'il faudrait en théorie étudier ne sont pas adaptés à ces techniques morphologiques.

Malgré les difficultés rencontrées, la démarche est globalement positive dans les deux structures. Elle aura permis l'extension d'accréditation du laboratoire d'ACP de l'IPC et un changement de méthode organisé, formalisé et efficace au sein du service d'ACPNP de la Timone. Dans les deux cas, démontrer la qualité technique du laboratoire et sa compétence dans la mise en œuvre de ces méthodes incontournables en ACP est très valorisant.

L'accréditation de l'IPC et de 16 autres laboratoires d'ACP en France pour une partie de leurs techniques prouve que cette démarche d'accréditation selon la norme 15189 est possible. Cette norme, pensée en premier lieu pour la biologie médicale, reste néanmoins mal adaptée aux spécificités de l'ACP et il serait souhaitable qu'un référentiel propre soit élaboré.

## BIBLIOGRAPHIE

1. AFNOR. NF EN ISO 15189:2012. Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence. 2012.
2. Fayol H. Administration industrielle et générale. Dunod; 1916.
3. Shewhart WA. Economic Control of Quality of Manufactured Products. Mac Millan; 1931.
4. Ishikawa K. Guide To Quality Control. Dunod; 1962.
5. ISO - Organisation internationale de normalisation [Internet]. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/home.html>
6. LOI n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires [Internet]. JORF n°0167, 2009-879 juillet, 2009 p. 12184. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000020879475>
7. La biologie médicale libérale en France : bilan et perspectives [Internet]. Inspection générale des affaires sociales; 2006 avril. Disponible sur: [http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport\\_IGAS\\_2006.pdf](http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_IGAS_2006.pdf)
8. Ballereau M. Rapport pour un projet de réforme de la biologie médicale [Internet]. Ministère de la santé, de la jeunesse, des sports et de la vie associative; 2008 sept. Disponible sur: [http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_pour\\_la\\_biologie\\_medicale.pdf](http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_pour_la_biologie_medicale.pdf)
9. COFRAC section SH. SH REF 05 : Règlement d'accréditation [Internet]. Révision 10. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-05>
10. Rapport anatomie et cytologie pathologiques [Internet]. Direction Générale de l'Offre de Soins; 2012 avril. Disponible sur: [http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport\\_Anatomie\\_cytologie\\_pathologiques.pdf](http://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Rapport_Anatomie_cytologie_pathologiques.pdf)
11. LOI n°2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale [Internet]. JORF n°0124, 2013-442 mai, 2013 p. 8954. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027478077>
12. AFAQAP. Recommandations de bonnes pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques [Internet]. 2009. Disponible sur: [http://www.afaqap.org/IMG/pdf/RBPACP\\_V2\\_2014\\_08\\_22.pdf](http://www.afaqap.org/IMG/pdf/RBPACP_V2_2014_08_22.pdf)
13. AFAQAP. Gestion d'une structure ACP - Recommandations et réglementations [Internet]. 2013 V3. Disponible sur: [http://www.afaqap.org/IMG/pdf/Gestion\\_structure\\_ACP\\_partie\\_1\\_2013.pdf](http://www.afaqap.org/IMG/pdf/Gestion_structure_ACP_partie_1_2013.pdf)
14. COFRAC - Comité français d'accréditation [Internet]. Disponible sur: <https://www.cofrac.fr/fr/home/>
15. Capron F. Enquête sur l'Accréditation en Anatomie et Cytologie Pathologiques dans l'Union Européenne. Bulletin de l'AIP n°61. juin 2015;147-8.
16. COFRAC section SH. SH REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation [Internet]. Révision 05. Disponible sur: <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>
17. COFRAC section SH. SH INF 50 : Portées types d'accréditation [Internet]. Révision 04. Disponible sur: [www.cofrac.fr/documentation/SH-INF-50](http://www.cofrac.fr/documentation/SH-INF-50)
18. COFRAC section SH. SH GTA 03 : Guide technique d'accréditation en anatomie et cytologie pathologiques [Internet]. Révision 00. Disponible sur: [www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-03](http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-03)
19. COFRAC section SH. SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes [Internet]. Révision 01. Disponible sur: [www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04](http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04)

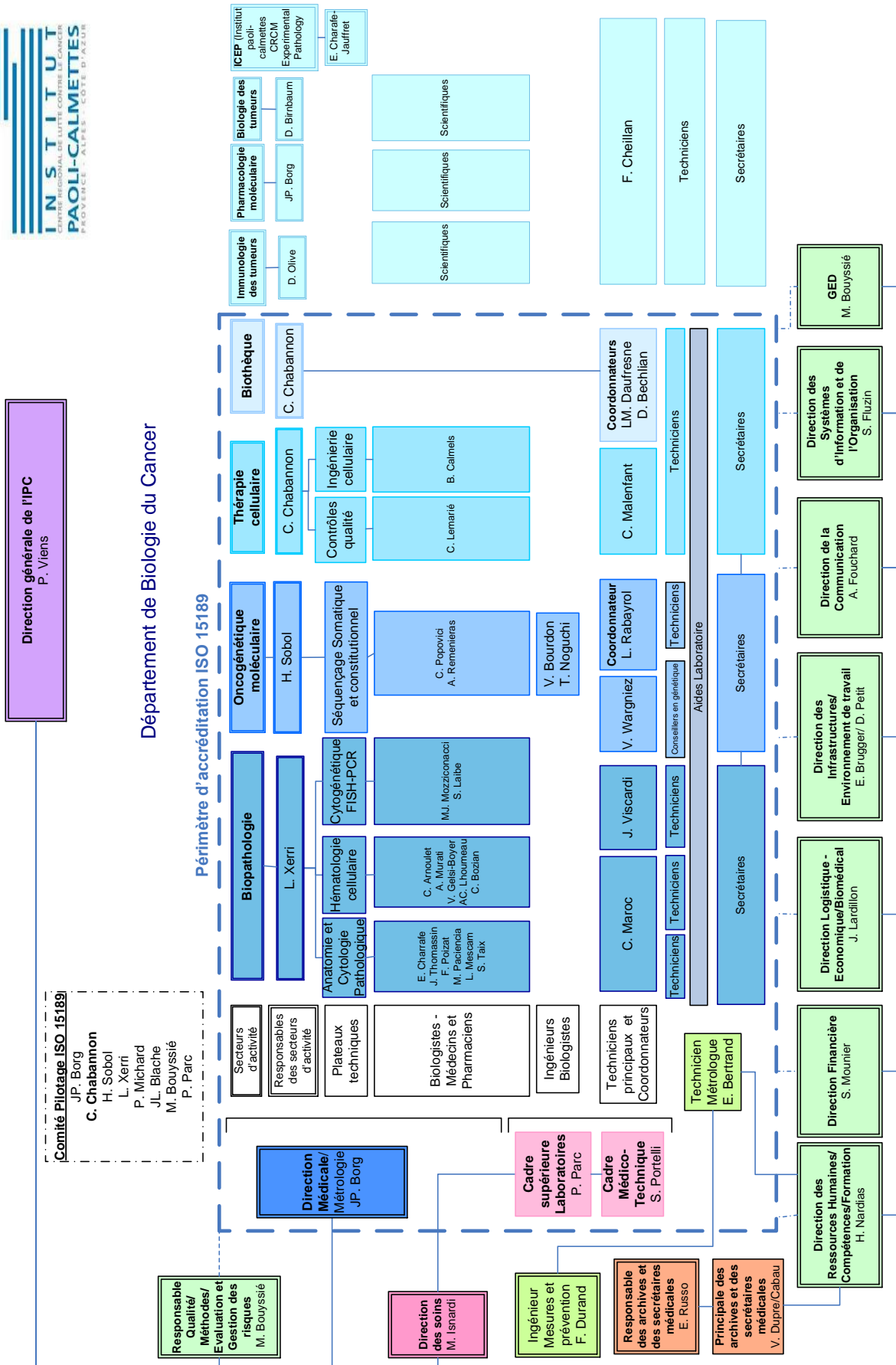
20. ISO. Guide ISO 30 : Matériaux de référence -- Termes et définitions choisis [Internet]. 2015. Disponible sur: <https://www.iso.org/fr/standard/46209.html>
21. Bichat X. Traité des membranes en général et de diverses membranes en particulier. Méquignon-Marvis; 1789.
22. Schwann T. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen. Verlag Harri Deutch; 1839.
23. Gabe M. Techniques histologiques : Par M. Gabe. Masson et Cie; 1968.
24. Ganter P, Jolles G. Histochimie normale et pathologique. Paris: Gauthier-Villars; 1969.
25. AFAQAP. Résultats essai d'aptitude HE, PAS, Réticuline. 2014.
26. Institut National de Santé Publique Québec. Critères d'évaluation de colorations histologiques développés par le QMP-LS [Internet]. 2012 juin. Disponible sur: [www.inspq.qc.ca/lspq/.../criteres\\_evaluation\\_histologie\\_NG\\_JS.pdf](http://www.inspq.qc.ca/lspq/.../criteres_evaluation_histologie_NG_JS.pdf)
27. Donhuijsen K, Schmidt U, Hirche H, van Beuningen D, Budach V. Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. *Hum Pathol.* juill 1990;21(7):709-14.
28. Bergers E, Jannink I, van Diest PI, Cuesta MA, Meyer S, van Mourik JC, et al. The influence of fixation delay on mitotic activity and flow cytometric cell cycle variables. *Hum Pathol.* janv 1997;28(1):95-100.
29. Cross SS, Start RD, Smith JH. Does delay in fixation affect the number of mitotic figures in processed tissue? *J Clin Pathol.* juill 1990;43(7):597-9.
30. Start RD, Flynn MS, Cross SS, Rogers K, Smith JH. Is the grading of breast carcinomas affected by a delay in fixation? *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1991;419(6):475-7.
31. Gephardt GN, Zarbo RJ. Extraneous tissue in surgical pathology: a College of American Pathologists Q-Probes study of 275 laboratories. *Arch Pathol Lab Med.* nov 1996;120(11):1009-14.
32. Layfield LJ, Witt BL, Metzger KG, Anderson GM. Extraneous tissue: a potential source for diagnostic error in surgical pathology. *Am J Clin Pathol.* nov 2011;136(5):767-72.
33. Les cancers en France [Internet]. INCa; 2016 Edition p. 71. Disponible sur: [http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers\\_en\\_france/#page=1](http://www.e-cancer.fr/ressources/cancers_en_france/#page=1)
34. Papanikolaou GN, Traut HF. Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. *The Commonwealth Fund*; 1943.
35. Garbar C, Mascaux C. De la cytologie conventionnelle à la cytologie en milieu liquide. *Bulletin de la Division Française de l'AIP* n°43. Juin 2006;117-20.
36. Whitlock EP, Vesco KK, Eder M, Lin JS, Senger CA, Burda BU. Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 15 nov 2011;155(10):687-97, W214-215.
37. Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* janv 2008;111(1):167-77.
38. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. *European Communities*; 2008.
39. Davey E, Barratt A, Irwig L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet Lond Engl.* 14 janv 2006;367(9505):122-32.

40. Cox JT. Liquid-based cytology: evaluation of effectiveness, cost-effectiveness, and application to present practice. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. nov 2004;2(6):597-611.
41. Conduite à tenir devant une femme ayant une cytologie cervico-utérine anormale / Critères de qualité des tests réalisés [Internet]. INCa; 2016. Disponible sur: [www.e-cancer.fr/content/download/178347/2343328/file/Conduite\\_a\\_tenir\\_cytologie\\_cervico-uterine\\_anormale\\_Criteres\\_qualite\\_tests\\_decembre\\_2016\\_mel\\_20170123.pdf](http://www.e-cancer.fr/content/download/178347/2343328/file/Conduite_a_tenir_cytologie_cervico-uterine_anormale_Criteres_qualite_tests_decembre_2016_mel_20170123.pdf)
42. Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014. « The reports of my demise have been greatly exaggerated. » (after a quotation from Mark Twain). *Acta Cytol*. 2015;59(2):121-32.
43. Plan cancer 2014-2019 [Internet]. Ministère des Affaires sociales et de la Santé; 2015 Février. Disponible sur: <http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs>
44. Duport N, Beltzer N. Evaluation du dépistage organisé du cancer du col de l'utérus dans les quatre départements pérennes et les neuf départements expérimentaux. *Expérimentation 2010-2014* [Internet]. Santé Publique France; 2016 Août. Disponible sur: [http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/\(id\)/PMB\\_13237](http://invs.santepubliquefrance.fr/pmb/invs/(id)/PMB_13237)
45. Cahier des charges d'étape préfiguration Vers une généralisation du dépistage organisé du cancer du col de l'utérus [Internet]. INCa; 2016 Avril. Disponible sur: [http://www.e-cancer.fr/content/download/164484/2108304/file/20160525\\_Instruction\\_DGS\\_et\\_CDC\\_du\\_25\\_mai\\_2016\\_relative\\_aux\\_modalites\\_de\\_designation\\_de\\_structures\\_regionales\\_de\\_prefiguration\\_de\\_la\\_generalisation\\_du\\_depistage\\_organise\\_du\\_CCU.pdf](http://www.e-cancer.fr/content/download/164484/2108304/file/20160525_Instruction_DGS_et_CDC_du_25_mai_2016_relative_aux_modalites_de_designation_de_structures_regionales_de_prefiguration_de_la_generalisation_du_depistage_organise_du_CCU.pdf)
46. Mode d'emploi ThinPrep 2000 System. Cytyc Corporation; 2007.
47. Shorr E. A new technic for staining vaginal smears. *Science*. 29 mars 1940;91(2361):321-2.
48. Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. *Science*. 1942;95(2469):438-439.
49. AFAQAP. Recommandations pour l'évaluation de qualité interne des frottis de dépistage du cancer du col utérin en France dans les structures d'anatomie et cytologie pathologiques. *Rev Fr Lab*. janv 1998;(299):53-6.
50. Directives concernant les programmes de contrôle de qualité en cytopathologie. Société canadienne de cytologie; 2005.
51. AFAQAP. Résultats essai d'aptitude coloration Papanicolaou / Harris-Shorr pour les FCU. 2015.
52. Darmon D, Moubarak C, Toullalan O, Boulet P. Le frottis cervico-utérin. *Exercer*. 2015;28(117):40-3.
53. Dépistage et prévention du cancer du col de l'utérus - Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé (EPS) [Internet]. HAS; 2013. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-08/referentieleps\\_format\\_2clic\\_kc\\_col\\_uterus\\_2013-30-08\\_vf\\_mel.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-08/referentieleps_format_2clic_kc_col_uterus_2013-30-08_vf_mel.pdf)

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACP :	Anatomie et Cytologie Pathologiques
ACPNP :	Anatomie Cytologie Pathologiques et Neuropathologie
AFAQAP :	Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques
AFNOR :	Association Française de Normalisation
ANAES :	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
CIQ :	Contrôle Interne de Qualité
CLCC :	Centre de Lutte Contre le Cancer
CNPath :	Conseil National Professionnel des Pathologistes
CRB :	Centre de Ressources Biologiques
CRB HV :	Centre de Ressources Biologiques Hématologie Vasculaire
CRB TAC :	Centre de Ressources Biologiques Tissus ADN Cellules
CRB TBM :	Centre de Ressources Biologiques Tumorotheque et Banque de Muscle
COFRAC :	Comité Français d'Accréditation
DBC :	Département de Biologie du Cancer
DGOS :	Direction Générale de l'Offre de Soins
EEQ :	Evaluation Externe de Qualité
EPP :	Evaluation des pratiques professionnelles
FCU :	Frottis cervico-utérin
GBEA :	Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale
HAS :	Haute Autorité de Santé
HES :	Hématoxyline Eosine Safran
HPS :	Hématoxyline Phloxine Safran
HPV :	Papillomavirus humain
IGAS :	Inspection Générale des Affaires Sociales
INCa :	Institut National du Cancer
IPC :	Institut Paoli-Calmettes
ISO :	International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation)
LBM :	Laboratoires de Biologie Médicale
RBPACP :	Recommandations de Bonnes Pratiques en Anatomie et Cytologie Pathologiques
SMPF :	Syndicat des Médecins Pathologistes Français

# Annexe 1 : Organigramme du Département de Biologie du Cancer de l'Institut Paoli-Calmettes



## Annexe 2 : Evaluation de la qualité de la coloration standard en histologie dans le service d'Anatomie et cytologie Pathologiques de l'Institut Paoli-Calmettes

### Critères d'évaluation de la qualité de la coloration HES/HPS

#### Présentation :

- Lame correctement identifiée. Lamelle/ruban bien positionnés.
- Absence de décollements, replis, bulles, fissuration, déchirure...

#### Qualité de la coloration :

- Coloration uniforme, sans effet de bordure.
- Qualité de la coloration trichromique :
  - Composants nucléaires :
    - noyaux colorés en bleu, clairement visibles à faible grossissement et contrastant avec les structures tissulaires environnantes.
    - chromatine nette de coloration bleu/violet
    - nucléole contrasté en bleu pourpre
    - membrane nucléaire bien définie
  - Caractéristiques morphologiques du cytoplasme :
    - bon contraste par rapport à la matrice extra-cellulaire
    - granules éosinophiles bien définies, de coloration rouge/orangée
    - mucus clair, éventuellement légèrement bleuté
  - Composants de la matrice extra-cellulaire
    - hématies rouge vif
    - collagène de coloration rouge/orangée ; la structure fibrillaire apparait lors de la manipulation de la vis micrométrique
  - Absence de coloration non spécifique (coloration d'autres composants tissulaires, précipités, dépôts, bruit de fond)

#### Evaluation :

Optimal = A	Bon = B	Moyen = C	Insuffisant = D
-------------	---------	-----------	-----------------

Optimal : parfait, proche de la perfection

Bon : résultat correct, avec quelques éléments perfectibles sur le plan technique

Moyen : qualité technique moyenne, à améliorer

Insuffisant : mauvaise qualité techniques, modifications nécessaires

**Limite d'acceptabilité :** la lame est rejetée si elle est évaluée C ou D.

**Annexe 3 : Dossier de validation de méthode pour la coloration standard en histologie dans le service d'Anatomie et cytologie pathologiques de l'Institut Paoli-Calmettes**

	<p><b>DOSSIER DE VALIDATION (PORTEE B) COLORATION STANDARD</b></p>	<p><b>REFERENCE : SH FORM 44</b></p> <p><b>INDICE DE REVISION : 00</b></p> <p><b>DATE D'APPLICATION : 15/04/2015</b></p>
---	--	--

**DOMAINE : Anatomie et cytologie pathologique FAMILLE : Histologie**  
Code HA1 selon SH INF 50

**COLORATION STANDARD HEMATOXYLINE-PHLOXINE-SAFRAN EN HISTOLOGIE**

Ce dossier porte sur la validation de la méthode de coloration standard Hématoxyline - Phloxine - Safran (HPS) en histologie.

Cette méthode a été établie à partir de données bibliographiques et adaptée par le laboratoire pour le fonctionnement du service. Ainsi, le périmètre d'accréditation demandé est une portée flexible étendue de type B.

Il s'agit d'une méthode qualitative puisque le résultat n'apporte pas d'information sur la quantité d'analyte mais sur la répartition topographique des composants tissulaires et cellulaires d'un échantillon permettant ainsi d'en réaliser une analyse morphologique.

La finalité de la méthode est le diagnostic de processus pathologiques éventuels. La coloration standard en histologie permet de reconnaître les différents tissus, les types cellulaires, d'analyser leur morphologie et en pathologie d'observer les anomalies, les proliférations anormales, de les interpréter, de les classer en fonction des référentiels connus et des données accumulées dans la littérature scientifique et médicale et ainsi d'établir un diagnostic histopathologique pour la prise en charge des patients.

DESCRIPTION DE LA METHODE	
<b>Analyte/Mesurande :</b>	Structures tissulaires et cellulaires des prélèvements fixés et inclus en paraffine.
<b>Principe de la Mesure :</b>	<p>Méthode de type qualitative.</p> <p>La coloration trichromique Hématoxyline-Phloxine-Safran (H.P.S) est une méthode de coloration élective des composants cellulaires et tissulaires permettant d'analyser leur morphologie :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coloration des noyaux par l'hémalum acide de Mayer en bleu / noir,</li> <li>- Coloration du cytoplasme et du stroma par la phloxine en nuances de rouge/rose,</li> <li>- Coloration du stroma, des fibres et du collagène par le safran en jaune/orangé.</li> </ul>



<b>Méthode de mesure :</b>	Coloration trichromique automatisée utilisant un automate de coloration Autostainer Leica Jung XL. Utilisation de microscopes optiques appréciant la qualité de la coloration.
<b>Valeurs de référence :</b>	L'appréciation de la qualité de la coloration est un paramètre subjectif pour lequel il n'existe pas de critères consensuellement admis. Afin de disposer de critères uniformes dans le service, une fiche d'évaluation a été élaborée. Cette fiche a été réalisée d'après les critères de l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologique (AFAQAP) utilisés lors du programme d'évaluation externe de la qualité pour la coloration HES en 2014 et les critères d'évaluation de colorations histologiques développés par le Quality management Program Laboratory Services (Quebec) ( <i>Cf. Annexe 5 : Bibliographie</i> )  Cette fiche détaille les critères histologiques et cytologiques d'une coloration de bonne qualité et une grille d'évaluation globale selon 4 lettres (A=Optimal, B=Bon, C=Moyen, D=Insuffisant). Il a également été défini une limite d'acceptabilité : une lame est rejetée si elle obtient une lettre C ou D. Cette grille a été validée par l'ensemble des pathologistes du service et est utilisée pour évaluer la qualité du contrôle interne de qualité (CIQ) quotidien et a servi de référence pour ce dossier de validation. ( <i>Cf. Annexe 4 : Critères d'évaluation de la qualité de la coloration HES/HPS</i> )
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	<i>Cf. Annexe 1 : Marquages CE et Annexe 2 : Références des réactifs</i>
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA

## MISE EN OEUVRE

<b>Opérateurs (Habilitation) :</b>	<p><b>Responsables de la réalisation du dossier de validation :</b> Mme AZARIO-CHEILLAN (Technicienne principale) / Mme FRANCHI Florence (Technicienne) / Mme NEGRE Armelle (Interne) / Dr POIZAT Flora (Médecin pathologiste) / Mme VRIGNAUD Pauline (Technicienne) Formations externes à la validation des méthodes de Mme AZARIO-CHEILLAN, Mme FRANCHI Florence, Dr POIZAT Flora (justificatifs disponibles au service formation)</p> <p><b>Opérateurs de la technique :</b> Techniciens habilités, encadrement et équipe médicale habilitée.</p> <p>SPR-GRHU-CPT.FOR-XX-XXXX : Fiches d'habilitation des techniciens en anatomo-pathologie SPR-GRHU-CPT.FOR-XX-XXXX : Fiche d'habilitation médecin en anatomie pathologique</p>
<b>Modalité et traitement des données, Plan expérimental :</b>	<p><i>Cf. Annexe 7 - Plan expérimental – Validation coloration HES/HPS</i></p> <p>Résultats colligés sous forme de tableaux.</p> <p>Pour la comparaison des méthodes, une lame est qualifiée « d'acceptée » si elle obtient une lettre A (Optimal) ou B (Bon) par les 3 pathologistes observateurs. Elle est qualifiée de « rejetée » si elle obtient une lettre C (Moyen) ou D (Insuffisant) par l'un des observateur. Pour la comparaison des méthodes, l'évaluation porte sur la concordance des résultats des 2 automates de coloration sur le critère lame acceptée ou rejetée.</p>

<b>Objectifs analytiques :</b>	L'objectif analytique de la technique est d'obtenir 95% de lames "acceptées" c'est-à-dire ayant obtenues une note A(Optimal) ou B (Bon) par les 3 pathologistes observateurs. Pour la comparaison des méthodes, l'objectif est d'obtenir 95% d'évaluations concordantes sur les 2 automates pour le critère lame « acceptée » ou « rejetée ». En cas de discordance une analyse systématique devra être réalisée.
<b>Procédure de validation :</b>	SVC-CESS-MTH.PRO-XX-XXXX : Vérification et validation de méthode SVC-CESS-MTH.MOP-XX-XXXX : Vérification-validation de méthode qualitative
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	SVC-CESS-MTH.PRO-XX-XXXX : Gestion de la portée flexible mixte (A et B) SVC-CESS-MTH.FOR-XX-XXXX : Fiche de suivi des modifications de la portée flexible
<b>Période d'évaluation :</b>	01/11/2014 au 27/03/2015.
<b>Date de mise en service :</b>	Dossier réalisé à postériori, appareil mis en service en 2005
<b>Autorisation par :</b>	Dr POIZAT Flora

## MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<p><b>Type d'échantillon primaire :</b>  - Echantillon tissulaire d'origine humaine fixé ou non fixé. Sous forme de pièce opératoire nécessitant un examen macroscopique ou sous forme d'une biopsie, microbiopsie ou produit de curetage ou de résection.  - Blocs en paraffine ou lames blanches de tissus d'origine humaine.</p> <p><b>Additif : Formol tamponné 4%</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Qualité de l'échantillon (conditionnement, orientation, encrage, électrocoagulation...)</li>   <li>- Conservation des lames blanches</li>   <li>- Blocs et lames blanches venant de l'extérieur avec une phase pré-analytique différente</li> </ul>	<p>SVC-BIOG-PRV.DTQ-XX-XXXX : Manuel de prélèvement et référentiel des analyses de biologie du cancer</p> <p>Sensibilisation du personnel :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Réunion formalisée entre les cadres de santé de l'établissement ("point des lits") permettant de relayer des informations organisationnelles entre cadres.</li> <li>- Echanges avec les prescripteurs lors des Réunion de Concertation Pluridisciplinaires (RCP)</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Au réfrigérateur entre 2 et 6°C pendant 1 mois. Réfrigérateur raccordé en continu à un logiciel de surveillance de la température des enceintes (SIRIUS)</li> </ul> <p>SPR-GDOC-LOG.DTQ-XX-XXXX : Utilisation du logiciel SIRIUS et exploitations des données</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cf Tests de robustesse</li> </ul>

## MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<p><b>Prétraitement de l'échantillon:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Transport</b></li> <li>- <b>Réception</b></li> <li>- <b>Enregistrement</b></li> <li>- <b>Examen à l'état frais</b></li> <li>- <b>Fixation</b></li> <li>- <b>Examen macroscopique fixé</b></li> <li>- <b>Déshydratation</b></li> <li>- <b>Enrobage</b></li> <li>- <b>Coupe au microtome</b></li> <li>- <b>Séchage</b></li> </ul>	<p><b>A toutes les étapes :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gestion des stocks, des réactifs et consommables.</li>   <li>- Identitovigilance</li>   <li>- Pour tous les automates</li>   <li><b>Transport :</b></li> <li>- Conditions de transport</li>   <li>- Durée du transport / Délai de fixation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SPR-APPR-LAB.MOP-XX-XXXX : Maîtrise des achats et des stocks pour le département de biologie du cancer.</li> <li>- Abonnement pour alcool, formol tamponné 4%, paraffine, histolemon, lames jetables de microtome, lames superfrost roses, cassettes.</li> <li>- Stockage de la paraffine fondue dans une étuve raccordée en continu à un logiciel de surveillance de la température des enceintes (SIRIUS)</li> <li>SPR-GDOC-LOG.DTQ-XX-XXXX : Utilisation du logiciel SIRIUS et exploitations des données</li>   <li>Vérification à toutes les étapes du processus de la concordance entre le nom du patient, le nombre de pots, le nombre d'examens demandés et la numérotation des pots, des blocs de paraffine, des lames.</li> <li>RISQ-GEN.PRO-XX-XXXX: Modalités de signalement et gestion d'un événement indésirable</li> <li>AML-RISQ-BLC.MOP-XX-XXXX: Identification et maîtrise des non conformités au sein du DBC</li> <li>AML-RISQ-BLC.FOR-XX-XXXX: Fiche de traçabilité des écarts liés à l'identitovigilance</li>   <li>SPR-MSUR-EQU.PRO-XX-XXXX : Gestion des équipements critiques et non critiques</li> <li>SPR-MSUR-SAV.PRO-03-XX-XXXX : Gestion des maintenances curatives matériels biomédicaux</li>   <li>Pour les prélèvements internes à l'IPC :  SVC-TRAN-PRV.MOP-XX-XXXX: Circuits des pièces opératoires du bloc au laboratoire  SVC-TRAN-PRV.MOP-XX-XXXX: Circuits des prélèvements en imagerie médicale</li>   <li>Pour les prélèvements venant de sites extérieurs :  Recommandation sur les conditions de transport (température, délais maximum, conditionnement)  SVC-BIOG-PRV.DTQ-XX-XXXX: Manuel de prélèvement et référentiel des analyses de biologie du cancer</li>   <li>Bons de demande d'examen anatomo-pathologique comportant la date et l'heure de prélèvement et la date et heure de fixation.</li> </ul>

## MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
	<p><b>Réception :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identitovigilance</li> <li>- Concordance entre le nombre de pots et le nombre d'examens demandés et concordance des numérotations.</li> </ul> <p><b>Enregistrement :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Risque d'intervertir des prélèvements</li> </ul> <p><b>Examen à l'état frais :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Risque de contamination inter-échantillons</li> </ul> <p><b>Fixation :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quantité de formol dans le pot du prélèvement et dans le bac du panier à cassettes.</li> <li>- Qualité de la fixation (risque de pièce insuffisamment fixée)</li> </ul>	<p>Vérification du nom, du numéro d'identification du patient et de la concordance des numérotations.  SVC-BIOG-PRV.PRO-XX-XXXX: Prise en charge des demandes d'examens par le département de biologie du cancer (DBC)  RISQ-GEN.PRO-XX-XXXX: Modalités de signalement et gestion d'un évènement indésirable  AML-RISQ-BLC.MOP-XX-XXXX: Identification et maîtrise des non conformités au sein du DBC  AML-RISQ-BLC.FOR-XX-XXXX: Fiche de traçabilité des écarts liés à l'identitovigilance</p> <p>Enregistrement et élaboration d'étiquettes autocollantes avec numérotation semi-automatique pour éviter la retranscription manuelle. Etiquetage soigneux sur le récipient avec vérification de la concordance de numérotation.  SPR-GDOC-LAB.ITC-XX-XXXX: Enregistrement de Biopathologie avec le logiciel GENNO  SVC-BIOP-ACP.FOR-XX-XXXX: Enregistrement de la réception des examens extemporanés  SVC-BIOP-ACP.MOP-XX-XXXX: Biopsie Extemporannée</p> <p>Nettoyage de la paillasse et nettoyage ou changement de matériel entre chaque patient.  SVC-BIOP-ACP.MOP-XX-XXXX: Macroscopie pièces fraîches  SVC-BIOP-ACP.DTQ-XX-XXXX: Guide et fiches de macroscopie des pièces opératoires.</p> <p>Vérification du volume de fixateur : au minimum 10x le volume du prélèvement et taille du récipient adaptée.  Immersion complète des cassettes dans le bac à cassettes lors de la macroscopie.</p> <p>Contrôle de la durée de fixation avec la date et l'heure de fixation notées sur le bon de demande d'examen.  Sélection quotidienne des pièces suffisamment fixées pour examen macroscopique : SVC-BIOP-ACP.FOR-XX-XXXX: Feuille de paillasse : macroscopie pièce fixée  Contrôle de la fixation à chaque prise en charge d'un prélèvement.  Possibilité de mettre en sur-fixation 24 ou 48h.  Reconditionnement si besoin.</p>

## MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
	<p><b>Examen macroscopique fixé :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identitovigilance</li>   <li>- Ciblage et épaisseur des échantillons sélectionnés</li>   <li>- Contamination inter-échantillons</li>   <li>- Erreur de numérotation des cassettes et/ou perte d'une cassette.</li>   <li><b>Déshydratation :</b></li> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation et maintenance des automates de déshydratation (Shandon Excelsior ES et 2 Leica ASP 300S)</li>   <li>- Inversion lors du changement des réactifs</li>   <li>- Cycle de déshydratation :               <ol style="list-style-type: none"> <li>1/Programmation de l'automate et lancement du cycle</li> <li>2/Lancement du cycle et bon déroulement de l'opération</li> <li>3/Maintien d'une qualité optimale des différents réactifs</li> </ol> </li> </ul> </ul>	<p>Vérification par le technicien et/ou par les internes de la concordance d'identité et de numérotation lors de la mise en cassette. Imprimante à cassettes évitant la retranscription manuelle.</p> <p>Formation et sensibilisation des macroscopistes. SVC-BIOP-ACP.MOP-XX-XXXX: Macroscopie pièces fixées SVC-BIOP-ACP.DTQ-XX-XXXX: Guide et fiches de macroscopie des pièces opératoires.</p> <p>Nettoyage de la paillasse et nettoyage ou changement de matériel entre chaque patient.</p> <p>Vérification tracée par une autre personne du nombre de cassettes réalisées pour chaque patient à la fin de la macroscopie. Poubelle de la hotte aspirante fermée pendant la macroscopie.</p> <p>SVC-NETT-EQU.MOP-XX-XXXX: Utilisation et entretien des automates à déshydratation Maintenances préventives annuelle des automates de déshydratation Présence de 3 automates permettant le bon fonctionnement du laboratoire en cas de panne.</p> <p>Traçabilité des changements de réactifs dans le cahier de vie de chaque automate. A chaque changement de réactif : passage d'un bloc témoin pour chaque automate. Ces blocs témoins sont enrobés, coupés et colorés en premier et font l'objet d'une validation technique tracée informatiquement.</p> <p>1/ Le choix du cycle est effectué en fonction de la taille des cassettes (grandes ou petites). La programmation est différente pour un cycle effectué sur un week-end ou un jour férié. 2/ Un autotest est effectué avant lancement du cycle. Une vérification est faite par le technicien au poste. 3/ L'automate signale la nécessité de changer les réactifs en fonction du nombre de blocs traités depuis le dernier changement.</p>

## MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
	<p><b>Enrobage :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation et maintenance des enrobeuses (2 Leica EG1150H) et plaques froides (2 Leica EG1150C)</li> <li>- Contamination inter-échantillon ou perte d'un échantillon</li> </ul> <p><b>Coupe, étalement et séchage :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation et entretien des microtomes</li> <li>- Identitovigilance</li> <li>- Epaisseur de coupe</li> <li>- Coupe plissée</li> <li>- Coupe striée (lame de microtome défectueuse, présence d'agrafes ou de fils dans l'échantillon)</li> <li>- Coupe incomplète (dégrossissage insuffisant)</li> </ul>	<p>Maintenance préventive annuelle des appareils. Présence de deux enrobeuses et plaques froides permettant un travail continu lors d'une défaillance de l'une d'elles.</p> <p>Les cassettes sont ouvertes et enrobées les unes après les autres pour éviter tout mélange entre les échantillons. Un nettoyage des pinces est réalisé entre chaque échantillon pour éviter toute contamination. L'enrobage des biopsies s'effectue en premier. SVC-BIOP-ACP.MOP-XX-XXXX: Mode opératoire enrobage et coupe des blocs de paraffine</p> <p>Maintenance préventive annuelle. SVC-BIOP-ACP.MOP-XX-XXXX: Mode opératoire enrobage et coupe des blocs de paraffine</p> <p>L'impression des lames est effectuée par une imprimante à partir d'une liste de travail générée informatiquement. Une vérification de la numérotation et de la correspondance avec chaque bloc est faite lors de la coupe de celui-ci.</p> <p>Vérification de l'épaisseur de coupe au niveau de l'affichage du microtome (3 µm pour une coloration standard)</p> <p>Utilisation d'une défripeuse (bain marie à 41°C). Chaque technicien vérifie l'affichage de la température de son bain marie.</p> <p>Renouvellement régulier des lames de microtome Retrait des agrafes ou fils dans l'échantillon avec une pince.</p> <p>Vérification que l'image du prélèvement est complète avant la coupe. Vérification à posteriori par le médecin que le nombre de fragments visibles sur la lame colorée correspond au nombre de fragments notés sur la feuille de macroscopie.</p>

<b>MAITRISE DES RISQUES</b>		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
	<p>- Phase possible de contamination</p> <p><b>Séchage :</b> - Séchage des lames dans une étuve à 60°</p>	<p>Nettoyage du bain-marie entre chaque coupe à l'aide d'une aiguille lancéolée et/ou d'un papier absorbant pour récupérer toute paraffine résiduelle à la surface de l'eau, évitant ainsi une contamination entre échantillon.</p> <p>Etuve raccordée en continu à un logiciel de surveillance de la température des enceintes (SIRIUS) SPR-GDOC-LOG.DTQ-XX-XXXX – Utilisation du logiciel SIRIUS et exploitations des données Le temps de séchage est adapté en fonction de la taille des lames.</p>
<p><b>Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aides laboratoire</li> <li>- Techniciens</li> <li>- Internes</li> <li>- Médecins pathologistes</li> </ul>	<p>Formation (initiale et continue) du personnel Suivi des compétences Qualification/Habilitation</p>	<p><b>Pour toutes les catégories de personnel :</b> SPR-GRHU-REI.PRO-XX-XXXX: Recrutement et intégration du personnel à l'IPC PLG-RESP-BLC.ORG-XX-XXXX: Organigramme du département de DBC PLG-RESP-BPT.PRO-XX-XXXX: Responsabilités et autorités en Biopathologie SPR-FORM-PLF.PRO-XX-XXXX: Expression des besoins de formation des salariés Dossier personnel du salarié Evaluation des Pratiques Professionnelles Formations obligatoires (« Nouveaux embauchés », « Risques chimiques et biologiques », « Prévention incendie », « Hôpital manager ») Formations internes assurance qualité : « Découverte de la qualité », « Maîtrise et rédaction d'un document qualité », « Indicateurs et tableaux de bord »</p> <p><b>Pour les techniciens et aides laboratoire :</b> SPR-GRHU-REI.MOP-XX-XXXX: Gestion du personnel medico-technique au sein du DBC - Formation pour chaque poste de travail avec autoévaluation et fiche d'évaluation établie par le formateur à l'issue de la formation. Habilitation accordée en fonction de l'évaluation. - Maintien des compétences au poste : rotation régulière sur les postes (planning établi par les cadres) et réhabilitation au poste de travail s'il n'a pas été occupé depuis plus de 6 mois. Matrice des compétences aux postes de travail. SPR-GRHU-CPT.FOR-XX-XXXX: Fiches</p>



<b>MAITRISE DES RISQUES</b>		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
		<p>d'habilitation des aides de laboratoire</p> <p>SPR-GRHU-CPT.FOR-XX-XXXX: Fiches d'habilitation des techniciens en anatomo-pathologie</p> <p>SPR-GRHU-CPT.PRO-XX-XXXX: Entretien annuel d'appréciation du personnel non médical</p> <p><b>Pour les internes et médecins pathologistes :</b></p> <p>SPR-GRHU-REI.MOP-XX-XXXX: Gestion du personnel médical au sein du DBC</p> <p>SPR-GRHU-CPT.FOR-XX-XXXX: Fiche d'habilitation médecin en anatomie pathologique</p>
<b>Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :</b>	- Variation de température (température de fonctionnement recommandée entre 15 et 30°C)	- Pièce de coupe climatisée - Campagne de relevés de température
<b>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</b> Cf Annexe 2 : Références des réactifs	<p>Gestion des stocks de réactifs</p> <p>Gestion des risques chimiques liés à certains réactifs</p> <p>Traçabilité</p> <p>Réactovigilance</p>	<p>SPR-APPR-LAB.MOP-XX-XXXX: Maîtrise des achats et des stocks pour le département de biologie du cancer</p> <p>Formation interne obligatoire « Gestion des risques chimiques et biologiques »</p> <p>Mise en place de moyens de prévention collectifs et individuels.</p> <p>Fiches de données de sécurité des réactifs.</p> <p>Traçabilité des lots et dates de péremptions (sauf alcool et histolemon) sur des cahiers de suivis des réactifs. Traçabilité des dates de péremption des lots de formol délivrés aux services de radiologie et endoscopie.</p> <p>Surveillance alerte ANSM pour les réactifs utilisés</p> <p>Alerte ascendante par les utilisateurs en cas de constatation d'incident ou de dysfonctionnement.</p> <p>SVC-VIGL-ALE.PRO-06-0008 : Gestion des alertes descendantes et ascendantes concernant les vigilances sanitaires réglementaires</p>
<b>Matériau de références (témoins) :</b> <b>8 blocs de tissu sain et pathologique avec un rendu de coloration A.</b>  <b>Cf Annexe 6 : Liste des blocs Gold Standard</b>	Absence de matériau de référence certifié. Nécessité d'un consensus médical pour la sélection	Elaboration d'une grille d'évaluation de la qualité de la coloration HES/HPS <i>Cf Annexe 4 : Evaluation de la qualité de la coloration HES/HPS</i>

## MAITRISE DES RISQUES

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
<p><b>Equipements :</b>  <b>Exigences métrologiques*</b>  <b>(définir les paramètres critiques)</b>  <b>Exigences informatiques*</b>  <b>spécifiques</b></p> <p><b>Automate de coloration :</b>  Autostainer Jung XL  Fournisseur : Leica  Référence : AXLST5015  N°de série : YYYY</p>	Utilisation et entretien corrects de l'automate	Manuel d'instruction de l'automate Formation des techniciens sur site à l'installation Habilitation des techniciens au poste de travail Entretien des appareils : Changement quotidien des réactifs de déparaffinage et hebdomadaire pour les colorants. SVC-BIOP-ACP.MOP-XX-XXXX: Mode opératoire Technique de coloration HES et rendu des lames
	Maintenances préventives et curatives	SVC-NETT-EQU.MOP-XX-XXXX: Utilisation et entretien des colorateurs Autostainer Jung XL Contrat de maintenance avec le constructeur. Maintenance préventive annuelle Fiche de vie gérée informatiquement (logiciel OPTIM) avec suivi des interventions préventives et curatives. Présence de deux automates pour un travail continu lors d'une maintenance ou d'une panne. SVC-NETT-EQU.FOR-XX-XXXX: Maintenance de l'autostainer XL n°1 SPR-MSUR-EQU.PRO-XX-XXXX: Gestion des équipements critiques et non critiques SPR-MSUR-SAV.PRO-XX-XXXX: Gestion des maintenances curatives matériels biomédicaux
	Oubli d'un réactif ou mauvaise position dans l'automate	Vérification de la quantité et du positionnement des réactifs dans l'automate
	Niveau de colorants insuffisant	Vérification du niveau des colorants
	Contrôle Interne de Qualité	Lame de contrôle interne quotidien colorée en début de matinée avant le passage des lames de routine. Evaluation selon la fiche d'évaluation de la qualité de la coloration HES/HPS et validation par un pathologiste habilité avant. Si la qualité est inférieure à la limite d'acceptabilité : signalement d'un dysfonctionnement et analyse des causes.
<p><b>Microscopes</b>  <b>Cf Annexe 3 : Référence des microscopes</b></p>	Entretien et maintenance Dysfonctionnement	Maintenance annuelle préventive Contrat de maintenance

\* item à renseigner si nécessaire

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

### SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES (indispensable en portée B)

<b>Résultats de l'étude des courbes ROC à partir d'une étude clinique :</b>	<b>Tests de spécificité analytique :</b> - Coloration unique par l'hémalum de Meyer : confirmation de la coloration nucléaire en bleu - Coloration unique par la phloxine : confirmation de la coloration des cytoplasmes et stroma en nuances de rouge/roses - Coloration unique par le safran : confirmation de la coloration du stroma, fibres et collagène en jaune/orangé  <b>Tests de sensibilité diagnostique :</b> test AFAQAP 2014. Résultat : note A (optimale) pour la coloration standard.
---	--

### CONTAMINATION

<b>Inter échantillon pour les paramètres sensibles :</b>	Maîtrise de la contamination par les procédures et modes opératoires mises en place (cf maîtrise des risques)
<b>Inter réactif si nécessaire :</b>	Maîtrise du change des réactifs par cahier de suivi (cf maîtrise des risques)
<b>Vérification bibliographique :</b>	<i>Cf Annexe 5 : Bibliographie</i>
<b>Vérification sur site :</b>	- La contamination est un aspect critique difficilement maîtrisable, mais faisant l'objet d'actions préventives multiples (cf maîtrise des risques)  - Les 60 lames test utilisées pour la comparaison des méthodes sont intercalées avec des lames de routine (1 lame test / 1 lame de routine / 1 lame test / 1 lame de routine....) Lors de la lecture des lames test par les pathologistes, une colonne permet de signaler la présence d'une contamination inter-échantillon.
<b>Résultats :</b>	Sur les 30 lames analysées, aucune contamination inter-échantillons n'a été mise en évidence.
<b>Conclusions et dispositions<sup>2</sup> :</b>	Pas de contamination inter-échantillons mise en évidence. Poursuite des mesures préventives.

<b>COMPARAISON DE METHODES</b>	
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire :</b>	Comparaison méthodes coloration trichromique sur deux automates différents utilisés dans le laboratoire : Autostainer Jung XL - Leica et Coverstainer - DAKO
<b>Nombre de mesures :</b>	30 lames
<b>Descriptif de l'échantillon étudié :</b>	Blocs de tissus sains et tumoraux de différents organes, coupés en deux exemplaires : lames colorées en même temps par deux automates de marque différentes. Les colorations sont réalisées par une technicienne dédiée à la phase de test. <i>Cf Annexe 8 : Liste des blocs utilisés</i>
<b>Méthode d'exploitation des résultats (études des concordances) :</b>	Lecture médicale et interprétation selon la grille d'évaluation de la coloration HES/HPS ( <i>Cf Annexe 4</i> ) Lecture indépendante par 3 pathologistes. Exploitation des résultats : Une lame est qualifiée « d'acceptée » si elle obtient une évaluation A(Optimal) ou B(Bon) par les 3 pathologistes observateurs. Elle est qualifiée de « rejetée » si elle obtient une évaluation C(Moyen) ou D(Insuffisant) par l'un des observateur. L'objectif analytique de la technique était d'obtenir 95% de lames « acceptées ». Pour la comparaison des méthodes, l'objectif était d'obtenir 95% d'évaluations concordantes sur les 2 automates pour le critère lame « acceptée » ou « rejetée ».
<b>Résultats et interprétations des discordances :</b>	<i>Cf Annexe 9 : Résultats comparaison des méthodes</i> Les 60 lames ont toutes obtenues une évaluation A ou B par les 3 pathologistes observateurs : 100% les lames ont été acceptées. Comparaison des méthodes : la totalité des lames ayant été acceptées pour les 2 méthodes la concordance est de 100% sur le critère lame acceptée ou rejetée.
<b>Conclusions et dispositions<sup>1</sup> :</b>	Les 2 méthodes donnent des résultats comparables.

<b>COMPARAISON INTER LABORATOIRES</b>	
<b>Méthode :</b>	8 lames "blanches" de tissus sains et pathologiques ont été colorées par nos 2 colorateurs (Autostainer Jung XL - Leica et Coverstainer – DAKO), par le laboratoire d'anatomie pathologique XA (Coverstainer – DAKO) et par le laboratoire XB (Coverstainer – DAKO). Les 32 lames ont été évaluées de façon indépendante par les 3 observateurs selon la grille d'évaluation de la coloration HES/HPS ( <i>Cf Annexe 4</i> )
<b>Résultats :</b>	Les 32 lames ont été évaluées « A » par les 3 pathologistes observateurs.
<b>Conclusions :</b>	Les 4 méthodes de colorations donnent des résultats comparables.

<sup>1</sup> Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).

**ROBUSTESSE**  
**(indispensable en portée B)**

**Données bibliographiques :**

*Cf Annexe 5 : Bibliographie*

**Résultats :**

Facteurs d'influence testés :

- **Phase pré-analytique différente** : sélection de 10 blocs provenant d'autres laboratoires pour comparaison

N° de Bloc	Laboratoire d'origine	Evaluation
15A00001	Laboratoire XB	A
15A00002	Laboratoire XB	B
15A00003	Laboratoire XB	A
15A00004	Laboratoire XC	B
15A00005	Laboratoire XC	A
15A00006	Laboratoire XD	A
15A00007	Laboratoire XD	B
15A00008	Laboratoire XD	B
15A00009	Laboratoire XE	A
15A00010	Laboratoire XE	A

- **Durée de conservation des lames blanches** : 5 lames blanches issues d'un même bloc (15A00011) ont été conservées au réfrigérateur entre +2 et +6°C et colorées à J1, J7, J14, J21 et J28.

Durée de conservation	Evaluation
J1	A
J7	A
J14	A
J21	A
J28	A

- **Durée de fixation différente** : 6 échantillons d'un même prélèvement (15A00012) avec des temps de fixation différents (5, 29, 41, 77, 101 heure et 7 jours).

Durée de fixation	Evaluation
H5	B
H29	A
H41	A
H77	A
H101	A
J7	A

	<p>- <b>Epaisseur de coupe</b> : 4 lames issues d'un même bloc (15A00013) coupées à 2, 3, 4 et 5 microns.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Epaisseur de coupe</th> <th>Evaluation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2μ</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>3μ</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>4μ</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>5μ</td> <td>A</td> </tr> </tbody> </table> <p>- <b>Température ambiante</b> (comparaisons lames témoins été/hiver) : Pas de différence de qualité observée sur les CIQ des deux premières semaines d'Aout 2014 et des 2 premières semaines de Février 2015.</p> <p>- <b>Test de reproductibilité</b> : La coloration est réalisée chaque semaine par différents techniciens, selon le planning technique permettant de tracer l'opérateur. De façon rétrospective sur l'année 2014, il n'y a pas été constaté de différence de qualité inter-opérateur.</p> <p>- <b>Taille des lames</b> : 3 « grandes lames » ont été colorées.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>N° de Bloc</th> <th>Evaluation</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>15A00014</td> <td>A</td> </tr> <tr> <td>15A00015</td> <td>B</td> </tr> <tr> <td>15A00016</td> <td>A</td> </tr> </tbody> </table>	Epaisseur de coupe	Evaluation	2μ	A	3μ	A	4μ	A	5μ	A	N° de Bloc	Evaluation	15A00014	A	15A00015	B	15A00016	A
Epaisseur de coupe	Evaluation																		
2μ	A																		
3μ	A																		
4μ	A																		
5μ	A																		
N° de Bloc	Evaluation																		
15A00014	A																		
15A00015	B																		
15A00016	A																		
<b>Conclusions et dispositions<sup>2</sup> :</b>	<p>Les variations des paramètres testés conduisent toutes à des résultats acceptables (A ou B) Les tests réalisés montrent la robustesse de la technique.</p>																		

<b>STABILITE (indispensable en portée B)</b>	
<b>Données bibliographiques :</b>	Suivi des recommandations fournisseurs
<b>Résultats :</b>	<p>- Veille constante de la stabilité grâce au passage quotidien d'un contrôle interne de qualité (CIQ) avant la coloration des lames de routines.</p> <p>- Pour la validation des méthodes : évaluation de la stabilité sur les lames de CIQ quotidien de 4 semaines consécutives du 02/03/2015 au 27/03/2015. Sur les 4 semaines consécutives, tous les CIQ ont été évalués A ou B</p>
<b>Conclusions et dispositions<sup>2</sup> :</b>	La stabilité des colorants est validée pour une utilisation pendant 7 jours.

**Commentaires éventuels :**  
L'ensemble des tests réalisés prouvent la validité opérationnelle de la technique.

## Annexe 1 : Marquages CE

Consommables	CE	CE IDV
Contenants divers	non	non
Cassettes	x	
Lames	x	
Lamelles		x
LAMES R35 X50* 07308036 VWR	x	
COLLE PERTEX (500ml) * F/00811	x	
Encres de marquage	non	non
Appareils	CE	CE IVD
Cryostat	x	
Imprimante K7	x	
Imprimante lames	x	
Automates à inclusion (Shandon Excelsior ES et 2 Leica ASP 300S)	x	
Automates enrobage (2 Leica EG1150H) et plaques froides (2 Leica EG1150C)	x	
Microtomes	x	
Colorateur	x	

## Annexe 2 : Références des réactifs

Etapes	Réactif	Fournisseur	Référence	CE	CE IVD
<b>Fixation</b>	Formol tamponné 4%	MM France	F/F0047		x
<b>Déshydratation</b>	Paraffine	Diawax	030980		x
	Histolemon	Carlo Erba	454915	Non	Non
	Alcool éthylique absolu	Carlo Erba	308609	Oui	
	Eau courante	NA	NA	NA	
<b>Coloration</b>	Alcool éthylique absolu	Carlo Erba	308609	Oui	
	Phloxine B	VWR	RAL361477	x	
	Safran alimentaire	Espig	NA	Non	Non
	Hémalun acide de Meyer	Oxoid	09381		x
	Histolemon	Carlo Erba	454915	Non	Non
	Eau courante	NA	NA	NA	

### Annexe 3 : Références microscopes utilisés pour diagnostic ou lecture des lames témoins

Emplacement	Fournisseur	N°Série	Référence OPTIM
Salle Multi-tête	LEICA	268039	001
	LEICA	265678	002
	ZEISS	253645	003
Bureau Dr JTP	LEICA	330854	004
Bureau Dr MPG	LEICA	197751	005
Bureau Dr FP	LEICA	332632	006
Bureau Pr LX	LEICA	230004	007
Bureau Pr ECJ	NIKON	589674	008
Bureau Dr ST	LEICA	199049	009
	ZEISS	451887	010
Bureau Dr LM	LEICA	197753	011
Pièce Coloration Cytologie	LEICA	258349	012

### Annexe 4 : Evaluation de la qualité de la coloration HES/HPS

*Annexe supprimée car figurant déjà en annexe de la thèse.*

### Annexe 5 : Bibliographie

*Annexe supprimée car figurant déjà dans la bibliographie de la thèse.*

### Annexe 6 : Liste des blocs Gold Standard

N° de Bloc	Organe
15A00017	Utérus tumoral
15A00018	Foie tumoral
15A00019	Grêle normal
15A00020	Estomac tumoral
15A00021	Ganglion lymphomateux
15A00022	Sein normal
15A00023	Sein normal
15A00024	Sein tumoral

### Annexe 7 : Plan expérimental – Validation de méthode coloration HES/HPS

*Annexe supprimée.*



## Annexe 8 : Liste des blocs utilisés pour comparaison de méthode

N° de Bloc	Organe
15A00025	Vessie normale
15A00026	Vessie tumorale
15A00027	Grêle normal
15A00028	Testicule normal
15A00029	Testicule tumoral
15A00030	Sarcome
15A00031	Utérus myome
15A00032	Col utérus normal
15A00033	Utérus tumoral
15A00034	Estomac normal
15A00035	Pancréas tumoral
15A00036	Pancréas normal
15A00037	Rein normal
15A00038	Ganglion tumoral
15A00039	Ovaire tumoral

N° de Bloc	Organe
15A00040	Rein atrophique
15A00041	Sein tumoral
15A00042	VB normale
15A00043	Prostate normale
15A00044	Foie normal
15A00045	Foie tumoral
15A00046	Utérus normal
15A00047	Sein tumoral
15A00048	Colon tumoral
15A00049	Sein tumoral
15A00050	Surrénale normale
15A00051	Surrénale tumorale
15A00052	Ovaire normal
15A00053	Colon normal
15A00054	Sein normal

## Annexe 9 : Résultats comparaison des méthodes

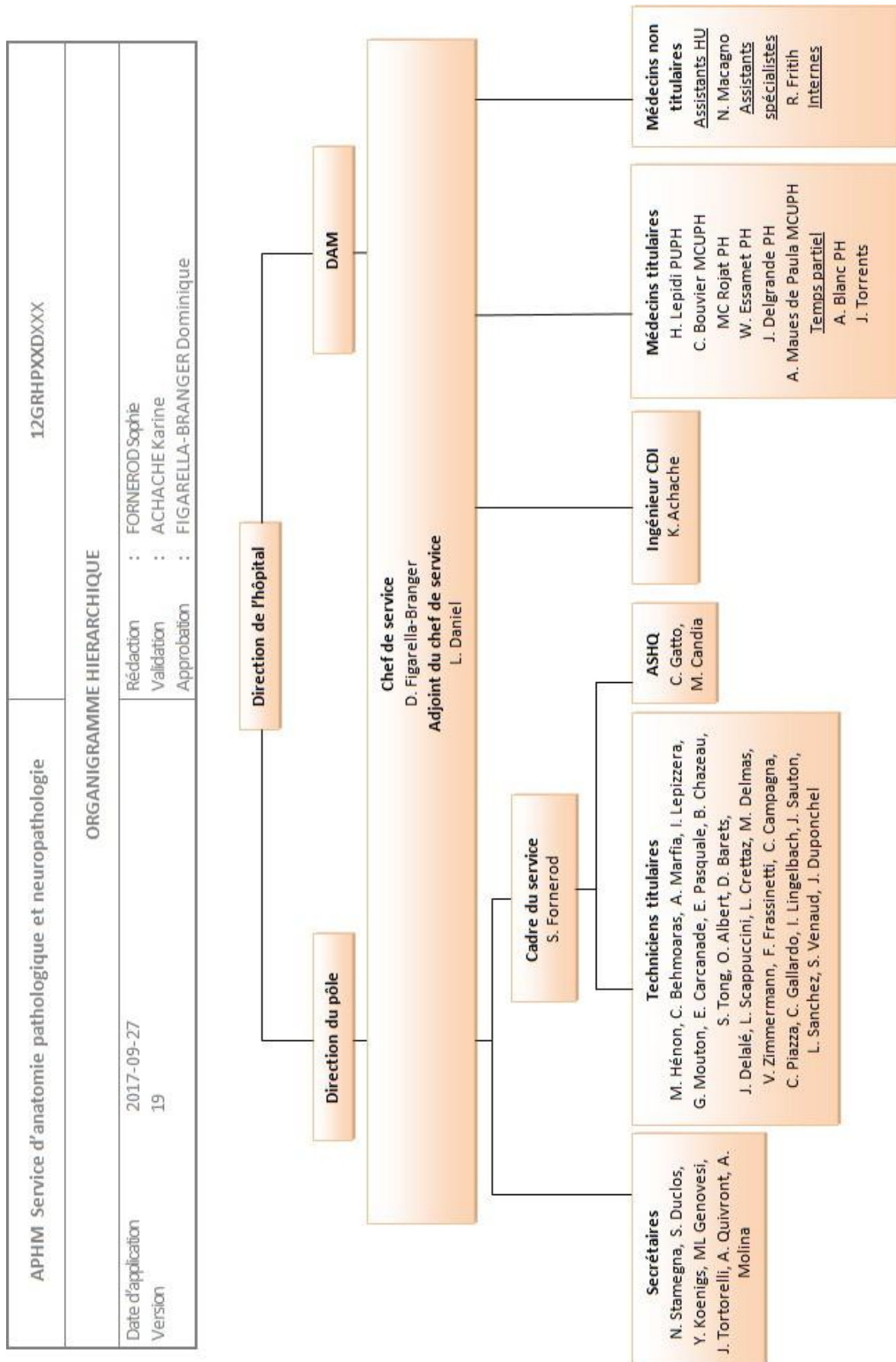
N° de Bloc	Leica – Autostainer Jung XL				Dako - Coverstainer				Concordance Oui / Non
	FP	ST	MPG	Acceptée ou Rejetée	FP	ST	MPG	Acceptée ou Rejetée	
15A00025	B	B	B	Acceptée	A	B	A	Acceptée	Oui
15A00026	B	B	A	Acceptée	B	B	A	Acceptée	Oui
15A00027	A	A	A	Acceptée	B	A	B	Acceptée	Oui
15A00028	A	A	B	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00029	B	B	B	Acceptée	A	B	A	Acceptée	Oui
15A00030	A	A	A	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00031	A	A	A	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00032	A	A	A	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00033	B	B	B	Acceptée	B	B	B	Acceptée	Oui
15A00034	A	B	B	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00035	B	B	B	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00036	A	B	B	Acceptée	B	B	B	Acceptée	Oui
15A00037	A	B	B	Acceptée	A	A	B	Acceptée	Oui
15A00038	A	B	A	Acceptée	B	B	A	Acceptée	Oui
15A00039	A	B	A	Acceptée	B	B	A	Acceptée	Oui
15A00040	B	B	A	Acceptée	A	B	A	Acceptée	Oui
15A00041	A	A	A	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00042	A	A	B	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00043	A	B	A	Acceptée	A	A	B	Acceptée	Oui
15A00044	B	B	B	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui

15A00045	A	A	B	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00046	B	A	B	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00047	A	B	A	Acceptée	B	A	B	Acceptée	Oui
15A00048	B	A	B	Acceptée	B	A	B	Acceptée	Oui
15A00049	B	A	B	Acceptée	B	A	A	Acceptée	Oui
15A00050	A	B	B	Acceptée	B	B	B	Acceptée	Oui
15A00051	A	A	A	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00052	A	A	A	Acceptée	A	A	A	Acceptée	Oui
15A00053	B	B	B	Acceptée	B	A	A	Acceptée	Oui
15A00054	B	A	B	Acceptée	B	B	B	Acceptée	Oui

### Annexe 10 : Résultats comparaison inter-laboratoires

N°de Bloc	IPC Leica Autostainer XL			IPC Dako Coverstainer			Labo XA Dako Coverstainer			Labo XB Dako Coverstainer			Concor- dance
	FP	ST	MPG	FP	ST	MPG	FP	ST	MPG	FP	ST	MPG	
15A00055	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui
15A00056	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui
15A00057	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui
15A00058	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui
15A00059	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui
15A00060	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui
15A00061	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui
15A00062	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Oui

## Annexe 4 : Organigramme du service d'Anatomie cytologie pathologiques et neuropathologie de l'hôpital de la Timone



## Annexe 5 : Evaluation de la qualité du frottis cervico-utérin dans le service d'Anatomie cytologie pathologiques et neuropathologie de l'hôpital de la Timone

### Critères d'évaluation de la qualité du frottis cervico-utérin

#### Présentation :

- Lame correctement identifiée. Lamelle bien positionnée, sans bulle.

#### Qualité de l'étalement :

- Etalement régulier, sans superposition

#### Qualité de la coloration :

- Coloration uniforme sur l'ensemble du spot

- Qualité de coloration :

- Noyaux des cellules malpighiennes :
  - Structures chromatiniennes nettes et distinctes
  - Noyaux colorés en bleu à bleu/violet
  - Bonne intensité de coloration
- Cytoplasmes des cellules malpighiennes :
  - Les couleurs prévues sont représentées où elles sont attendues dans des gammes d'orange, jaune orangé, saumon/rose et bleu/vert
  - Bonne intensité de coloration
- Noyaux des cellules glandulaires endocervicales et/ou métaplasiques :
  - Bon détail chromatinien
  - Membrane bien visible
  - Nucléole rouge/violacé
- Cytoplasmes des cellules glandulaires endocervicales et/ou métaplasiques :
  - Cytoplasme nuageux/ transparent ou vacuoles bien visibles
  - Mucus bleu/violet si présent
  - Cils rouges si présents
- Absence de coloration non spécifique (dépôts, bruit de fond)

#### Evaluation :

Optimal = A	Bon = B	Moyen = C	Insuffisant = D
-------------	---------	-----------	-----------------

Optimal : technique de très bonne qualité permettant une interprétation optimale du frottis

Bon : qualité technique correcte, avec quelques éléments perfectibles

Moyen : qualité technique médiocre, à améliorer

Insuffisant : mauvaise qualité technique ne permettant pas l'interprétation

**Limite d'acceptabilité :** la lame est rejetée si elle est évaluée C ou D.

**Annexe 6 : Dossier de validation de méthode pour la cytologie cervico-utérine en milieu liquide dans le service d'Anatomie et cytologie pathologiques et neuropathologie de l'hôpital de la Timone**

<b>APHM ACPNP</b>	<b>DOSSIER DE VALIDATION (PORTEE B) CYTOLOGIE CERVICO-UTERINE EN MILIEU LIQUIDE</b>
-----------------------	---

<b>DOMAINE : Anatomie et cytologies pathologiques Sous-famille : Cytologie</b>
<b>Cytologie cervico-utérine en milieu liquide Code CA1 selon SH INF 50</b>
<b>Processus simple <input checked="" type="checkbox"/> ; Processus complexe <input type="checkbox"/></b>

DESCRIPTION DU PROCESSUS		
<b>Cytologie cervico-utérine par étalement monocouche et coloration de Papanicolaou</b>	<b>Éléments à vérifier</b>	Modalités de vérification/validation <sup>2</sup> : <ul style="list-style-type: none"> <li><input checked="" type="checkbox"/> 1. Répétabilité</li> <li><input type="checkbox"/> 2. Fidélité intermédiaire</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 3. Variabilité inter-opérateurs</li> <li><input type="checkbox"/> 4. Justesse</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 5. Exactitude</li> <li><input type="checkbox"/> 6. Sensibilité et spécificité analytique</li> <li><input type="checkbox"/> 7. Incertitudes</li> <li><input type="checkbox"/> 8. Etendue de mesure</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 9. Comparaison de méthodes</li> <li><input type="checkbox"/> 10. Interférences</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 11. Contamination</li> <li><input checked="" type="checkbox"/> 12. Robustesse et fiabilité des réactifs</li> <li><input type="checkbox"/> 13. Intervalle de référence</li> </ul>

**Argumentaire :** La méthode est constituée de 3 étapes différentes (étalement cellulaire par technique monocouche, coloration et mise en place d'un film sur la lame). Néanmoins ces 3 sous-processus sont interdépendants et leurs performances ne peuvent pas être étudiées séparément. Aussi nous nous plaçons dans le cas d'un processus simple.

## Cytologie cervico-utérine par étalement monocouche et coloration de Papanicolaou

Portée A  ; Portée B

L'étalement monocouche est une méthode reconnue marquée CE, mise en œuvre dans le service suivant les recommandations du fournisseur mais la coloration est une méthode adaptée par le laboratoire au fonctionnement du service.

### DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Cellules des prélèvements cervico-vaginaux recueillies et conservées dans une solution PreservCyt® de Hologic®.
<b>Principe de la Méthode :</b>	Méthode de type qualitatif comportant 3 étapes techniques : - Etalement automatisé sur lames en monocouche - Coloration automatisée polychromique Papanicolaou - Assemblage automatisé des lames  Identification morphologique par microscopie optique.
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Prélèvement(s) cellulaire(s) d'origine humaine, en milieu liquide : frottis cervico-utérin.
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Flacon ThinPrep PapTest pré-rempli par le fabricant avec liquide PreservCyt.
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Aucun.
<b>Unités :</b>	Non applicable.

<p><b>Critères d'interprétation :</b></p>	<p>La cytologie cervico-utérine est une méthode qualitative dont le but est d'analyser les caractéristiques cytologiques des cellules recueillies en suspension.</p> <p>Il n'existe pas de critères consensuellement admis pour apprécier la qualité de cette technique.</p> <p>Afin de disposer de critères uniformes dans le service, une fiche d'évaluation a été élaborée à partir des critères de l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologique (AFAQAP) utilisés lors du programme d'évaluation externe de la qualité pour la coloration Papanicolaou sur frottis cervico-utérin de 2015 (Cf. Annexe 1 : Bibliographie)</p> <p>Cette fiche détaille les critères cytologiques d'une technique de bonne qualité et une grille d'évaluation selon 4 lettres (A=Optimal, B=Bon, C=Moyen, D=Insuffisant)</p> <p>La limite d'acceptabilité est définie entre B et C : une lame est rejetée si elle obtient une notation C ou D.</p> <p>Cette grille est validée par l'ensemble des pathologistes et cyto-techniciens interprétant des cytologies cervico-utérines et sert de référence pour ce dossier de validation</p> <p>(Cf. Annexe 2 : Critères d'évaluation de la qualité du frottis cervico-utérin)</p>
<p><b>Marquage CE (Oui/Non) :</b></p>	<p>Oui. Cf. Annexe 3 : marquages CE</p>
<p><b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b></p>	<p>Non applicable</p>
<p><b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Processeur ThinPrep® 2000 Hologic®</li> <li>- Colorateur Tissue-Tek® DRS 2000 Sakura®</li> <li>- Monteuse de film Tissue-Tek® Film® Sakura®</li> </ul>
<p><b>Référence des réactifs :</b></p>	<p>Cf. Annexe 4 : Références des réactifs</p>
<p><b>Matériau d'étalonnage (références) :</b></p>	<p>Absence de matériau d'étalonnage ou de référence disponible.</p> <p>Le matériel de référence a été sélectionné par le laboratoire : 5 lames de qualité jugée optimale ont été sélectionnées pour servir de référence.</p>
<p><b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b></p>	<p>Non applicable</p>

<b>MISE EN ŒUVRE</b>	
<b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b>	<p>Dr ROJAT-HABIB Marie-Christine (Médecin pathologiste)  Mme NEGRE Armelle (Interne)  Mme SCAPPUCCINI Lorena (Cytotechnicienne)  Mme PASQUALE Elisabeth (Cytotechnicienne)  Mme ACHACHE Karine (Ingénieur Qualité)</p> <p>Formation externe à la validation des méthodes du Dr ROJAT-HABIB Marie-Christine et de Mme ACHACHE Karine dont les justificatifs sont disponibles auprès de la cadre du service.</p>
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	12ANAPXX V1 : Procédure de vérification/validation de méthode
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	12 ANAP XX V1 : Procédure de gestion de la portée
<b>Période d'étude :</b>	02/05/2017 au 25/09/2017
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	<p>Mise en routine de la nouvelle méthode de coloration prévue en novembre 2017.</p> <p>Processeur ThinPrep® 2000 Hologic® mis en service en 2005,</p> <p>Colorateur Tissue-Tek® DRS 2000 Sakura® mis en service en 2005.</p> <p>Assembleuse de film Tissue-Tek® Film® Sakura® mise en service en 2017.</p>



## MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>3</sup>	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
<b>Matière (échantillons)</b>	Identitovigilance	5	Formation et information du personnel	<p>Vérification à toutes les étapes du processus de la concordance entre le nom du patient et la numérotation, sur le bon de demande d'examen, le ou les pots de prélèvement et la ou les lames.</p> <p>0AMETPXX : Procédure Identitovigilance du laboratoire</p> <p>12GRHPXXDXXX : Fiche de mission référent identitovigilance</p> <p>12PREPXXMXXX : Gestion des non-conformités majeures à la réception</p> <p>0AACQPXXEXXX : Fiche de dysfonctionnement</p> <p>12PREPXXMXXXEXXX : Traçabilité d'une non-conformité majeure à la réception : prise en charge impossible</p>
	Réalisation du prélèvement	4	Information des préleveurs	<p>- Instructions de prélèvement disponibles dans le catalogue d'examens et de prises en charges techniques du service ACPNP et sur le site internet du laboratoire <a href="http://fr.ap-hm.fr/site/acnpn">http://fr.ap-hm.fr/site/acnpn</a></p> <p>- Echanges avec les médecins préleveurs lors des Réunions de Concertation Pluridisciplinaires (RCP) hebdomadaires</p>
	Type de contenants	4	Information des préleveurs	<p>Instructions de prélèvement, prescription, conservation et acheminement disponibles dans le catalogue d'examens et de prises en charges techniques du service ACPNP et sur le site internet du laboratoire <a href="http://fr.ap-hm.fr/site/acnpn">http://fr.ap-hm.fr/site/acnpn</a></p>
	Délai et température avant traitement analytique	2	Gestion logistique (distribution, coursiers, conditions de transport)	<p>Critères d'acceptation/de refus : 12PREPXX : Réception et distribution des prélèvements</p> <p>Procédures logistiques communes avec le LBM : 00PREPXX : Transport des prélèvements 00PREPXX : Acheminement des prélèvements des services de soin de la Timone.</p>
	Interférences	4	Information des préleveurs	<p>Instructions de prélèvement disponibles dans le catalogue d'examens et de prises en charges techniques du service ACPNP et sur le site internet du laboratoire <a href="http://fr.ap-hm.fr/site/acnpn">http://fr.ap-hm.fr/site/acnpn</a></p>

<sup>3</sup> A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

## MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>3</sup>	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
<b>Milieu</b>	Conditions de conservation des échantillons (t°, durée, ...)	2	Evaluation métrologique	Respect des instructions de conservation des fournisseurs. Les échantillons et les réactifs pouvant être conservés à température ambiante et le laboratoire étant climatisé, ces paramètres ne sont pas considérés comme critiques sur le plan métrologique.  Suivi des lots et dates de péremption
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (t°, ...)	2		
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	2	Respect des conditions environnementales requises	Respect des exigences d'installation et d'utilisation du fournisseur : Conservation de la solution PreservCyt loin de toute forme de chaleur Installation du processeur ThinPrep sous hotte aspirante et à distance des sources de vibration.  Respect des recommandations fournisseur de température pour les automates : 15 à 32° pour ThinPrep 2000 10 à 40° pour le colorateur et la monteuse de film
<b>Matériel (équipements)</b>	Eviter les dysfonctionnements et pannes	4	Utilisation et maintenance correctes des équipements	Respect des recommandations fournisseurs Formation des techniciens sur site à l'installation Formations et habilitations (Cf. Main d'œuvre) Maintenances préventives régulières Contrats de maintenance  12ANAPXX : Cytologie 12ANAPXXDXXX : Prise en charge des cytologies en monocouche 12ANAPXXDXXX : Colorations des cytologies 0AGRMPXX : Gestion des équipements 0AGRMPXXEXXX : Fiche de vie 0AGRMPXXEXXX : Fiche d'intervention 12ANAPXXDXXX Maintenance de l'automate monocouche Hologic 12ANAPXXDXXX Maintenance de l'automate DRS2000 12ANAPXXDXXX Maintenance de l'automate Coverslipper
	Coupure d'eau	4	Approvisionnement en eau du colorateur	Vérification que les bacs de rinçage à l'eau courante se remplissent correctement 12ANAPXXDXXX : Colorations des cytologies

## MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>3</sup>	Éléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
	Surveillance des dérives de qualité	4	Détection précoce des dérives	Toutes les lames sont lues par un cytotechnicien titulaire du Diplôme Universitaire Enseignement Spécialisé de Techniques Anato et Cythopathologique (ESTAC) et/ou un pathologiste assurant une veille continue de la qualité et la détection précoce des dérives  Inscription à la prochaine EEQ de l'AFAQAP
	Surveillance des incidents et risques d'incidents liés au matériel, réactifs et consommables	4	Réactovigilance	Organisation de la réactovigilance au niveau institutionnel avec référent réactovigilance au sein du service
	Contamination inter-échantillon	5	Respect des conditions opératoires du fournisseur  Formation habilitation du personnel	Filtres à usage unique 12ANAPXXDXXX : Prise en charge des cytologies en monocouche  Cf. Main d'œuvre
	Défaillance du système informatique	5	Gestion des équipements et des dysfonctionnements informatiques	0AGRMPXX : Gestion de l'informatique 12GRMPXXMXXX : Utilisation du logiciel TDHC

## MAITRISE DES RISQUES

(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

5M	Points critiques	Echelle de criticité <sup>3</sup>	Eléments à maîtriser	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire
<b>Matériel (réactifs et consommables)</b>	Gestion des stocks de réactifs et consommables	3	Gestion des stocks Acceptation à réception des réactifs	0AGRMPXX Gestion des fournitures - évaluation des fournisseurs
	Dilution de certains réactifs	1	Evaluation métrologique	Les instruments servant à la dilution ne font pas l'objet d'une suivi métrologique car il s'agit de pipettes de 5mL à usage unique marquées CE
		4	Respect des modes opératoires	Cf. Méthode
	Conservation	2	Cf. Milieu	Cf. Milieu
<b>Méthode</b>	Risque d'erreur dans l'utilisation de la méthode	4	Respect des instructions fournisseurs Respect des procédures et modes opératoires	Formation/habilitation du personnel Cf. Main d'œuvre  12ANAPXX : Cytologie 12ANAPXXDXXX : Prise en charge des cytologies en monocouche 12ANAPXXDXXX : Colorations des cytologies
<b>Main d'œuvre</b>	Compétence et maintien de compétence du personnel	5	Formation et évaluation des compétences du personnel, plan de formation.  Traçabilité de l'occupation des postes de travail	12GRHPXXDXXX : Organigramme hiérarchique 12GRHPXXDXXX : Organigramme qualité 0AGRHDXXX : Processus GRH 0AGRHPXX : Gestion des ressources humaines 0AGRHPXXEXXX : Formation et habilitation 12GRHPXXEXXX : Fiche de formation et d'habilitation : technicien de cytologie 12GRHPXXEXXX : Fiche de formation et d'habilitation : médecin pathologiste - Lecture FCU 0AGRHPXXDXXX : Liste du personnel 0AGRHPXXDXXX : Composition du dossier personnel AP-HM 12GRHPXXMXXX : Accueil des internes dans le service Matrice des compétences du personnel tenue à jour  Occupation des postes de travail tracée sur planning du personnel

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

**Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...)** : Absence de matériel de référence disponible. Les échantillons proviennent de prélèvements de patientes dont la quantité est suffisante pour effectuer des tests de performance sans compromettre le diagnostic et la prise en charge.

Cf Annexe 5 : Liste de lames utilisées pour les tests de performance

<b>REPETABILITE</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier)	
Echantillons	Conclusion <sup>4</sup>
- 2 échantillons (un normal et un pathologique) techniqués 3 fois de suite. - Même opérateur, même lot de réactifs, à la suite les uns des autres.	Conforme

**Argumentaire de la conclusion** : Les 3 passages sont homogènes en termes de densité cellulaire, de représentation des différents types cellulaires, de qualité d'étalement et de coloration.

Cf. Annexe 6 : Résultats des tests de répétabilité

<b>FIDELITE INTERMEDIAIRE</b> Applicable ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source <sup>4</sup> )	Conclusion <sup>5</sup>
Type de matrice (plasma, sérum, CIQ, niveaux...)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

**Argumentaire de la conclusion** : Non applicable (N/A) pour cette méthode morphologique qualitative.

<sup>4</sup> Conforme/non conforme

<b>VARIABILITE INTER-OPERATEURS</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable	
<b>Opérateur évalué 1</b>	Cf. analyse de robustesse
<b>Opérateur évalué 2</b>	

**Argumentaire de la conclusion :** La méthode est en grande partie automatisée et les opérateurs sont habilités. Cet item est abordé dans l'analyse de robustesse.

<b>JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>								
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de pairs)	Biais (%) /groupe de pairs	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) / moyenne générale	Biais (%) Limite <sup>4</sup>	Conclusion <sup>5</sup>
Echantillon CIQ niveau 1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Echantillon CIQ niveau 2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

**Argumentaire de la conclusion :** Non applicable pour cette méthode morphologique qualitative, pas de CIQ externalisés.

<b>EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)</b> Contrôles quantitatifs <input type="checkbox"/> ; Contrôles qualitatifs <input checked="" type="checkbox"/>							
Echantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de pairs)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) / groupe de pairs	Biais (%) / toute technique	Biais (%) limite <sup>4</sup>	Conclusion
				A renseigner pour les contrôles quantitatifs			

**Argumentaire de la conclusion :** Inscription à l'EEQ de l'AFAQAP pour 2018.

<b>SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>		
Vrais positifs	N/A	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP : N/A
Faux positifs	N/A	
Vrais négatifs	N/A	
Faux négatifs	N/A	

**Argumentaire de la conclusion :** Non applicable. Il n'existe pas de matériel de référence disponible qui puisse permettre de calculer une sensibilité ou une spécificité analytique.

<b>INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :</b> Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input checked="" type="checkbox"/> ; calcul		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	N/A	N/A
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	N/A	N/A
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	N/A	N/A
Quantification de l'incertitude (niveau xxx) :	N/A	N/A

**Argumentaire de la conclusion :** Pas de calcul possible pour cette méthode qualitative. Les facteurs d'influences ont été recherchés dans l'analyse de risque et font l'objet de modalités de maîtrise adaptées.

<b>LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
Limite de détection :	N/A

**Argumentaire de la conclusion :** Non applicable. Aucune bibliographie n'indique de limite de détection. Il n'est pas possible de contrôler le nombre de cellules présentes dans un échantillon pour pouvoir tester ce paramètre.

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier)	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	Cf Annexe 1 : Bibliographie
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :</b>	Méthode précédente : coloration Harris-Shorr
<b>Nombre de mesures :</b>	30
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	Non applicable
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liste des échantillons tests référencés en annexe 5.</li> <li>- Résultats des évaluations pour chaque lame dans tableau en annexe 7.</li> </ul> Une lame est qualifiée d' « acceptée » si elle obtient une note A(Optimal) ou B(Bon) par les 2 observateurs. Elle est qualifiée de « rejetée » si elle obtient une note C(moyen) ou D(insuffisant) par l'un des observateurs. <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse des discordances entre lames acceptées et rejetées.</li> </ul>
<b>Equation de la droite de régression :</b>	Non applicable
<b>Diagramme des différences et/ou des rapports :</b>	Absence de discordance.

**Argumentaire de la conclusion :** Conforme. Les 2 méthodes sont de qualité équivalente.  
Cf. Annexe 7 : Résultats des tests de comparaison des méthodes et stabilité des réactifs.

<b>ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>		
	<b>Etude bibliographique (sources et valeurs)</b>	<b>Etude expérimentale (valeurs)</b>
<b>Limite de détection :</b>	N/A	N/A
<b>Limite de quantification :</b>	N/A	N/A
<b>Limite supérieure de linéarité :</b>	N/A	N/A

**Argumentaire de la conclusion :** Non applicable. Aucune bibliographie n'indique de limite de détection. Il n'est pas possible de contrôler le nombre de cellules présentes dans un échantillon pour pouvoir tester ce paramètre.



<b>.INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> <b>(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)</b> <b>Applicable ; non applicable (à justifier) ☒</b>	
Hémolyse	N/A
Turbidité	N/A
Bilirubine, ictère	N/A
Médicaments	N/A
...	N/A

**Argumentaire de la conclusion :** Les recherches bibliographiques ont permis d'identifier les éléments suivants comme susceptibles d'interférer avec la qualité :

- Utilisation d'une quantité importante de gel lubrifiant non hydrosoluble avec carbomère,
- Utilisation de colorants (acide acétique, lugol) lors d'une colposcopie,
- Sang en quantité abondante,
- Médicaments ou contraceptifs vaginaux.

Ces interférences sont connues par les préleveurs et font partie des recommandations courantes de bonnes pratiques de prélèvement pour tout FCU. Les préleveurs savent donc qu'il faut éviter ces situations. La pratique du laboratoire montre que ce point est bien maîtrisé : un seul cas d'interférence avec des colorants utilisés lors d'une colposcopie avant la réalisation du FCU a été responsable d'une impossibilité d'interpréter le FCU. Le médecin préleveur avait d'ailleurs informé de cette interférence sur le bon d'examen.

<b>CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> <b>(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)</b> <b>Applicable ☒ ; non applicable (à justifier)</b>	
<b>Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, <math>\beta</math>HCG, ...)</b> :	1 flacon de Preservcyt ne contenant pas de prélèvement est techniqué quotidiennement pendant 5 jours sur le processeur Thin Prep, intercalé entre les échantillons de comparaison des méthodes puis également intercalé dans le colorateur avec les lames colorées en Papanicolaou.
<b>Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...)</b> :	N/A

**Argumentaire de la conclusion :** Conforme, absence de contamination inter-échantillons.  
Cf. Annexe 8 : Résultats des tests de contamination.

<b>ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS</b> (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier)	
<b>Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Durée et conditions de conservation des échantillons</b> : un même échantillon a été techniqué et coloré en Papanicolaou à J1, J22, J54.</li> <li>- <b>Température ambiante</b> : Comparaisons de 5 lames techniquées en été et en hiver (non réalisé, planifiée pour le mois de janvier 2018)</li> <li>- <b>Variabilité inter-opérateurs</b> : lors de la comparaison des méthodes, 6 échantillons sont comparés chaque jour pendant 5 jours consécutifs. Les techniques sont effectuées par au moins 2 opérateurs différents. Il n'a pas été constaté de différence de qualité inter-opérateurs.</li> </ul>
<b>Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...</b>	Le passage des échantillons de comparaison des méthodes sur 5 jours consécutifs permet de valider la stabilité des réactifs pendant toute la durée d'utilisation prévue (5 jours).

**Argumentaire de la conclusion** : Conforme, absence d'impact des paramètres testés sur la qualité, stabilité des réactifs validés pour 5 jours d'utilisation.

Cf. Annexe 9 : Résultats des tests de robustesse

Cf. Annexe 7 : Résultats des tests de comparaison des méthodes et stabilité des réactifs.

<b>INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B)</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Valeurs de référence</b>	N/A

**Argumentaire de la conclusion** : Absence de valeurs de références pour cette technique.

<b>DECLARATION d'APTITUDE</b>
Conclusion : méthode conforme, mise en routine prévue en novembre 2017.  Autorisée par : Dr ROJAT-HABIB Marie-Christine.

## Annexe 1 : Bibliographie

Annexe supprimée car figurant déjà dans la bibliographie de la thèse.

## Annexe 2 : Evaluation de la qualité du frottis cervico-utérin

Annexe supprimée car figurant déjà en annexe de la thèse.

## Annexe 3 : Références du matériels et des consommables

Matériel	Fournisseur	Référence	Numéro de série	CE	CE IVD
Processeur ThinPrep 2000	Hologic	70031-001	03596F05Q0		X
Colorateur Tissue-Tek® DRS 2000	Sakura	4931	493110409	X	
Monteuse de film Tissue-Tek® Film®	Sakura	4742	1130	X	

Etapes	Consommables	Fournisseur	Référence	CE	CE IDV
Monocouche	Kit PapTest	Hologic	70096-004		X
Coloration	Pipette	Dominique Dutscher	160510	X	
Montage	Film	Sakura	4770		X
	Coupe film	Sakura	4772		
	Filtre charbon	Sakura	6160		

## Annexe 4 : Références des réactifs

Etapes	Réactif	Fournisseur	Référence	CE	CE IVD
Monocouche	Alcool 95°	Christalco	11371008	X	
Coloration Harris-Shorr	Amonia 28%	VWR	21190.292	X	
	Alcool 100°	Cooper	0256	X	
	Eau stérile	Fresinus	B230531	X	
	Safesov	VWR	00699464		X
	Hématoxyline de Harris	VWR	1092530500		X
	Colorant de Shorr	VWR	1092750500		X
Coloration Papanicolaou	EA50	Ral Diagnostics	367600-1000		X
	Orange G	Ral Diagnostics	361630-1000	X	
	Hématoxyline de Harris	VWR	1092530500		X
	Alcool 100°	Cooper	0256	X	

	Safesov	VWR	00699464		<b>X</b>
	Eau stérile	Fresinus	B230531	<b>X</b>	
	Acide chlorhydrique 37%	VWR	20252.290	<b>X</b>	
	Alcool 95°	Christalco	11371008	<b>X</b>	
<b>Montage</b>	Xylène	VWR	28973363	<b>X</b>	

### Annexe 5 : Liste de lames utilisées pour les tests de performance

Test	N° de patient	Diagnostic
Répétabilité	17HHH00001	HSIL
	17HHH00002	Sans anomalie
Comparaison des méthodes et stabilité des réactifs	17HHH00003	Sans anomalie
	17HHH00004	Sans anomalie
	17HHH00005	Sans anomalie
	17HHH00006	Sans anomalie
	17HHH00007	Sans anomalie
	17HHH00008	Sans anomalie
	17HHH00009	Sans anomalie
	17HHH00010	Sans anomalie
	17HHH00011	Sans anomalie
	17HHH00012	LSIL*
	17HHH00013	Sans anomalie
	17HHH00014	Sans anomalie
	17HHH00015	Sans anomalie
	17HHH00016	Sans anomalie
	17HHH00017	Sans anomalie

Test	N° de patient	Diagnostic
Comparaison des méthodes et stabilité des réactifs (suite)	17HHH00018	Sans anomalie
	17HHH00019	HSIL**
	17HHH00020	Sans anomalie
	17HHH00021	Sans anomalie
	17HHH00022	Sans anomalie
	17HHH00023	Sans anomalie
	17HHH00024	Sans anomalie
	17HHH00025	Sans anomalie
	17HHH00026	LSIL*
	17HHH00027	Sans anomalie
	17HHH00028	Sans anomalie
	17HHH00029	Sans anomalie
	17HHH00030	Sans anomalie
	17HHH00031	Sans anomalie
	17HHH00032	Sans anomalie
Robustesse	17HHH00033	Sans anomalie

\* Lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade

\*\* Lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade

### Annexe 6 : Résultats des tests de répétabilité (07/08/2017)

N° de Patient	N° de passage	Evaluation
17HHH00001	Passage 1	A
	Passage 2	A
	Passage 3	A
17HHH00002	Passage 1	A
	Passage 2	A
	Passage 3	A

**Annexe 7 : Résultats des tests de comparaison des méthodes et stabilité des réactifs.  
(du 17 au 21/07/2017)**

N° de Patient	Harris-Shorr			Papanicolaou			Concordance Oui / Non
	MCRH	LS	Acceptée ou Rejetée	MCRH	LS	Acceptée ou Rejetée	
17HHH00003	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00004	B	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00005	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00006	A	A	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00007	A	A	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00008	A	A	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00009	A	B	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00010	A	A	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00011	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00012	A	A	Acceptée	B	A	Acceptée	Oui
17HHH00013	A	B	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00014	A	B	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00015	B	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00016	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00017	B	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00018	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00019	A	B	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00020	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00021	A	B	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00022	A	A	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00023	B	B	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00024	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00025	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00026	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00027	A	A	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00028	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00029	A	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00030	A	B	Acceptée	A	B	Acceptée	Oui
17HHH00031	A	A	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui
17HHH00032	B	B	Acceptée	A	A	Acceptée	Oui

**Annexe 8 : Résultats des tests de contamination**

N° du test	Contamination (Oui/Non)
1	Non
2	Non
3	Non
4	Non
5	Non

## **Annexe 9 : Résultats des tests de robustesse**

Durée et conditions de conservation des échantillons :

<b>Durée de conservation</b>	<b>Evaluation</b>
J1	A
J22	A
J54	A

Température ambiante : Comparaisons de 5 cytologies techniquées en été et en hiver (non réalisé, planifié en janvier 2018)

Variabilité inter-opérateurs : Il n'a pas été constaté de différence de qualité entre les différents opérateurs de la technique.

**Annexe 7 : Habilitation technicien de cytologie dans le service d'Anatomie cytologie pathologiques et neuropathologie de l'hôpital de la Timone**

AP-HM Service d'anatomie pathologique et de neuropathologie	12GRHPXXEXXX
<b>Fiche de formation et d'habilitation : Technicien cytologie</b>	

Poste / mission	Cytologie		
Nom, prénom			
Fonction	Technicien		
Habilitation initiale	<input type="checkbox"/>	Habilitation de confirmation	<input type="checkbox"/>
Période de la formation	du		au
<b>Critères d'habilitation</b> Liste des tâches	Nombre de fois à réussir la tâche	Période de formation	Formateur
<b>TECHNIQUES</b>			
Cyocentrifugation de liquide	5		
Prise en charge des cytolyts	5		
Gestion des lames de cytoponction ou d'étalement	5		
Préparation des frottis monocouches	5		
Colorations des lames	5		
Rendu des lames	5		
Immunohistochimie des ponctions thyroïdiennes	5		
Gestion des réserves de prélèvements	5		
Préparation des solutions	5		
Gestion des commandes	5		
Déstockage	5		
Entretien des appareils	5		
<b>LECTURE</b>			
Liquides articulaires	50-100*		
Frottis	50-100*		

\* Sous réserve de l'évolution du ratio nb lecture OK/nb lecture total

Date : _____/_____/_____	
Visa du responsable du poste	Visa du cadre

## Annexe 8 : Habilitation pathologiste lecture FCU dans le service d'Anatomie cytologie pathologiques et neuropathologie de l'hôpital de la Timone

AP-HM Service d'anatomie pathologique et de neuropathologie	12GRHPXXEXXX
<b>Fiche de formation et d'habilitation : Médecin pathologiste - Lecture frottis cervico-utérin</b>	

Poste / mission	Médecin pathologiste - Lecture frottis cervico-utérin (FCU)			
Nom, prénom				
Fonction	Médecin			
Habilitation initiale	<input type="checkbox"/>	Habilitation de confirmation	<input type="checkbox"/>	
Période de la formation	du		au	
<b>Critères d'habilitation</b> Liste des tâches	Durée de formation minimale et/ou nombre d'examens à pratiquer sous tutorat	Période de formation	Avis du tuteur	Tuteur(s)
Connaitre les principes de la méthode (étalement / coloration) et les critères d'évaluation définis dans le service			<input type="checkbox"/> Acquis <input type="checkbox"/> Non acquis	
Connaître les principes de rédaction des comptes rendus pour les FCU (Système Bethesda)			<input type="checkbox"/> Acquis <input type="checkbox"/> Non acquis	
Savoir rechercher des informations médicales dans le dossier informatisé (AXIGATE)			<input type="checkbox"/> Acquis <input type="checkbox"/> Non acquis	
Connaitre et maîtriser le logiciel informatique TDHC			<input type="checkbox"/> Acquis <input type="checkbox"/> Non acquis	
Savoir interpréter un FCU et en rédiger le compte rendu	50-100*		<input type="checkbox"/> Acquis <input type="checkbox"/> Non acquis	
Remise à niveau après une période d'interruption > 3 mois	20-30*		<input type="checkbox"/> Acquis <input type="checkbox"/> Non acquis	

\* Sous réserve de l'évolution du ratio nb lecture OK/nb lecture total

Commentaires éventuels :

Date : \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Visa du pathologiste responsable du secteur ou de la technique

Visa du chef de service



## SERMENT D'HIPPOCRATE

**Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.**

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans **aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions**. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas **usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité**.

**J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.**

Je ne tromperai **jamais leur confiance** et **n'exploiterai pas le pouvoir hérité** des circonstances pour forcer les consciences.

**Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera**. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

**Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers** et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

**Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission**. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

**J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.**

**Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.**



Démarche qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques :  
application à la validation de deux méthodes qualitatives selon  
la norme NF EN ISO 15189

**Résumé :**

En France, l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 est obligatoire et effective depuis 2013. Concernant les structures d'Anatomie et Cytologie Pathologiques (ACP), l'accréditation n'est pas obligatoire et relève d'une démarche volontaire. Quelques laboratoires d'ACP en France se sont déjà engagés dans cette voie et ont obtenu une accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 pour une ou plusieurs technique(s).

L'objectif de ce travail est de préciser les bases méthodologiques de la validation des méthodes appliquée à l'ACP et de les mettre en pratique par la réalisation de deux dossiers de validation. Le premier dossier a été réalisé en 2015 à l'Institut Paoli-Calmettes (IPC) et concerne la coloration standard en histologie. Il était réalisé dans le but d'étendre l'accréditation du laboratoire d'ACP, déjà accrédité pour une technique d'immunohistochimie. Le second dossier a été réalisé en 2017 dans le service d'ACPNP du centre hospitalier de la Timone et porte sur la cytologie cervico-utérine en milieu liquide. Il s'agissait du premier dossier de validation réalisé dans ce service et il s'intégrait notamment dans le cadre d'un changement de technique de coloration.

La réalisation d'un dossier de validation de méthode comporte de très nombreuses étapes nécessitant une collaboration étroite entre médecins et techniciens. Les étapes les plus importantes sont la planification, l'analyse des risques et facteurs de maîtrise, l'élaboration du plan expérimental et sa mise en œuvre. Pour les 2 méthodes, les tests réalisés ont permis de confirmer la validité opérationnelle des techniques. Le premier dossier a reçu l'évaluation positive du Comité Français d'Accréditation (COFRAC).

Les difficultés rencontrées sont essentiellement liées à l'application de la Norme NF EN ISO 15189. Cette norme, destinée aux laboratoires de biologie médicale, est peu adaptée aux spécificités de l'ACP. La démarche est toutefois globalement positive pour les 2 laboratoires. Elle aura notamment permis l'extension d'accréditation du laboratoire d'ACP de l'IPC et un changement de méthode organisé, formalisé et efficace pour le service d'ACP et de Neuropathologie de la Timone.

L'accréditation de l'IPC et de 16 autres laboratoires d'ACP en France pour une partie de leurs techniques prouve que cette démarche d'accréditation selon la norme 15189 est possible. Cette norme reste néanmoins mal adaptée à l'ACP et il serait souhaitable qu'un référentiel propre soit élaboré.

**MOTS CLES :**

Assurance qualité ; anatomie cytologie pathologiques ; validation de méthode ; coloration standard ; histologie ; cytologie cervico-utérine ; accréditation ; norme NF EN ISO 15189.