

**GROUPE HOSPITALIER AVICENNE – JEAN VERDIER – RENE MURET**

**125 RUE DE STALINGRAD – 93009 BOBIGNY CEDEX**

**Contacts :**

Dr F BARAN-MARSZAK – LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE T : 01 48 95 56 41 / F : 01 48 95 56 48  
Pr A MARTIN – SERVICE D'ANATOMIE & CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES T : 01 48 95 56 01 / F : 01 48 95 56 02

**BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE**

<b>PATIENT</b>	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
Nom :	Né(e) :	
Prénom :	Date de naissance :	

**MEDECIN DEMANDEUR**

NOM : .....

ADRESSE : .....

**CLINICIEN REFERENT**

NOM : .....

ADRESSE : .....

**EXAMEN DEMANDE : CLONALITE LYMPHOÏDE B ET OU T**

CONTEXTE DE LA DEMANDE.....

DATE DE LA DEMANDE.....

**MATERIEL TRANSMIS**

Diagnostic anatomo-pathologique, ou cytologique : (joindre les comptes rendus)

Référence Laboratoire : Date du prélèvement :

Nature (sang, moelle, biopsie, coupes paraffine, liquide...) :

**RECOMMANDATIONS DE TRANSPORT ET DELAI DE RENDU DE RESULTAT**

Biopsies congelées : transport en carboglace, sans rupture de la chaîne du froid

Sang et moelle : transport à température ambiante. Livraison dans un délai de 24H après le prélèvement

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

**GROUPE HOSPITALIER AVICENNE - J. VERDIER - R. MURET**

125 RUE DE STALINGRAD 93009 BOBIGNY CEDEX - STANDARD : + 33 1 48 95 55 55

LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE (PR F CYMBALISTA) CONTACT: DR F BARAN-MARSZAK  
TEL SECRETARIAT: 01 48 95 56 41 / FAX : 01 48 95 56 48.

SERVICE D'ANATOMIE & CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES (PR A MARTIN) CONTACT: PR A MARTIN  
TEL SECRETARIAT: 01 48 95 56 01 / FAX : 01 48 95 56 02.

**Informations pratiques concernant l'analyse de la clonalité IgH/TCR dans les lymphomes (y compris cutanés) à l'hôpital Avicenne**

**Pour quels patients :**

Patients atteints d'une pathologie lymphoïde faisant suspecter un lymphome.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Lymphome (y compris cutané) - clonalité IGH/TCR » de l'AP-HP.

**Dans quels buts :**

Préciser le caractère clonal d'une population lymphoïde B ou T

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Lymphome (y compris cutané) - clonalité IGH/TCR » de l'AP-HP.

**Sur quels prélèvements :**

Sang : 20mL sur EDTA - Moelle : 1mL sur EDTA - Liquides

Tumeur primitive congelée (ganglion, peau, etc...)

ADN extrait de coupes de tissus en paraffine (10 coupes de 10µm)

**Où adresser sa demande :**

Votre demande sera traitée à l'hôpital Avicenne.

- Le prélèvement frais sera réceptionné par le laboratoire d'hématologie qui réalise l'extraction d'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation.

**Référent :** Dr Fanny Baran-Marszak, [fanny.baran-marszak@avc.aphp.fr](mailto:fanny.baran-marszak@avc.aphp.fr), tél : 01 48 95 56 44

**Laboratoire :** Laboratoire d'Hématologie - Hôpital Avicenne

125 rue de Stalingrad - 93009 Bobigny Cedex

Réception : 01 48 95 56 46

- Pour les biopsies congelées et les blocs en paraffine le prélèvement est préparé ou adressé au service d'anatomopathologie, qui le transmet au laboratoire d'hématologie pour l'analyse moléculaire et son interprétation :

**Référent :** Pr Antoine Martin, [antoine.martin@avc.aphp.fr](mailto:antoine.martin@avc.aphp.fr), tél : 01 48 95 56 01

**Laboratoire :** Service d'Anatomie & cytologie pathologiques - Hôpital Avicenne

125 rue de Stalingrad - 93009 Bobigny Cedex

Réception : 01 48 95 56 05

**Que faut-il envoyer :**

Au laboratoire d'hématologie :

- les prélèvements de sang, de moelle ou tous liquides
- les résultats des analyses cytologiques et immunophénotypiques

- le bon de demande d'examen (téléchargeable sur le site) dûment rempli, comportant notamment les **coordonnées complètes des correspondants** pour leur assurer une bonne transmission des résultats.

Au service d'anatomie pathologique :

- le prélèvement tissulaire congelé
- le bloc paraffine avec le compte rendu d'anatomo-pathologie correspondant
- le bon de demande d'examen (téléchargeable sur le site) dûment rempli, comportant notamment les **coordonnées complètes des correspondants** pour leur assurer une bonne transmission des résultats.

### **Quel est le délai de rendu de l'analyse ?**

A partir de la réception du prélèvement au laboratoire d'hématologie, un délai minimum de **15 jours** est à prévoir. Le résultat est adressé aux correspondants qui seront mentionnés dans le Bon de demande d'examen.

En cas de situation d'urgence, et après entente préalable avec les biologistes référents le délai de rendu peut être réduit.

### **Quelles techniques utilisons-nous ?**

Au laboratoire d'hématologie :

- Extraction d'ADN à partir des prélèvements frais et congelés
- Recherche d'un réarrangement clonal des gènes IGH et ou TCR $\gamma$  par amplification par PCR des jonctions V-D-J.
- le réarrangement des autres gènes IG ne sera entrepris que dans un second temps.
- La sensibilité des techniques est comprise entre 1-10%

Au service d'anatomie pathologique :

- Coupe et analyse en HE du tissu congelé, vérification du degré d'infiltration tumorale
- Coupes des blocs paraffine et extraction d'ADN, transmises au laboratoire d'hématologie.

**FICHE MEDICALE**

<b>Pathologie</b>	<b>Analyse</b>
Lymphome (y compris cutané)	<i>Clonalité IgH/TCR</i>

**But : Diagnostic**

Déterminer la nature clonale d'une population suspecte de lymphome

**Indications**

Analyse nécessaire : en cas de pathologie lymphoïde pour laquelle l'analyse morphologique et phénotypique est difficile et fait suspecter un lymphome sans permettre de l'affirmer formellement. Lors d'éventuelles rechutes quand il est important de distinguer rechute et pathologie nouvelle.

Analyse recommandée : biopsies diagnostiques de lymphome cutané T (ref 6), dans les biopsies digestives en cas de sprue réfractaire.

Analyse exploratoire :

- Bilan d'extension sanguin et médullaire
- Evaluation de la maladie résiduelle ou de la contamination du greffon par le lymphome B ou T connu
- Lymphomes sans problème diagnostique particulier (en dehors des cas cités ci-dessus).

**Recommandations générales concernant les prélèvements**

**ATTENTION** : ces informations restent générales et le demandeur d'analyses doit se référer aux « Bon de demande et Fiche d'informations pratiques » avant d'envoyer son échantillon.

- Validation de l'indication du test porté par le pathologiste sur des prélèvements tissulaires et le pathologiste ou l'hématologue sur des prélèvements cellulaires. Prélèvements tumoraux (pièce opératoire ou biopsie), de préférence sur tissu congelé (ou fixé en RNA later) ou sur blocs de tumeur fixée en formol tamponné pendant moins de 48h.
- Contrôle histologique/cytologique indispensable de la cellularité de l'échantillon tumoral.
- Prélèvements de sang ou moëlle (ou autres liquides biologiques) effectués sur tube EDTA.

**Principales techniques utilisées et validées**

**ATTENTION** : ces informations restent générales et chaque site d'analyse peut utiliser des techniques qui lui sont spécifiques (cf Fiche d'informations pratiques).

1. Amplification des jonctions V-(D)-J des gènes IG et TCR.
2. Les techniques utilisées sont toutes basées sur des PCR multiplex avec migration sur gel de polyacrylamide.

**Pour la clonalité B**, les techniques sont issues d'un projet européen dit « Biomed-2 » d'harmonisation des techniques moléculaires dans la détection de clonalité lymphoïde, et

les produits PCR migrent dans un gel de séquence dénaturant (oligonucléotides fluorescents et analyse par un logiciel type Genescan) ou non dénaturant (après formation d'hétéroduplex)

**Pour la clonalité T**, le choix des amores de PCR et les techniques de migration sont encore évolutives (projet Biomed 2 et Euroclonalité).

La participation aux contrôles de qualité mis en place par le groupe RuBIH/GBMHM (Groupe de Biologie Moléculaire des Hémopathies Malignes) est nécessaire pour les équipes pratiquant ces tests. Si la reproductibilité intercentre des analyses IgH est excellente, celle du TCR gamma l'est moins, justifiant l'optimisation citée ci-dessus et une analyse intégrée des résultats.

### **Délai moyen de rendu de résultat**

15 jours (parfois plus en cas de nécessité de réaliser de multiples analyses de manière séquentielle).

### **Informations complémentaires**

**Le test moléculaire ne peut à lui seul permettre d'affirmer ou d'éliminer un lymphome** et doit toujours être intégré aux données morphologiques, phénotypiques, génétiques et cliniques. Les résultats du compte rendu de PCR doivent être intégrés dans le compte rendu histopathologique ou hématologique puisque **c'est sur l'ensemble des données morphologiques, phénotypiques, moléculaires et cytogénétiques associées à la clinique que le diagnostic définitif sera porté.**

### **Références (sur les indications et les techniques)**

1. M. Beylot-Barry, O. Dereure, B. Vergier, S. Barete, L. Laroche, L. Machet, M. Delfau-Larue, M. D'Incan, F. Grange, N. Ortonne, J.P. Merlio, M. Bagot pour le GFELC. Prise en charge des lymphomes T cutanés : Recommandations du Groupe Français d'Etude des Lymphomes Cutanés (Annales de Dermatologie et de Vénérérologie, sous presse)
2. Brüggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, Jasani B, Ott M, Delsol G, Orfao A, Tiemann M, Herbst H, Langerak AW, Spaargaren M, Moreau E, Groenen PJ, Sambade C, Foroni L, Carter GI, Hummel M, Bastard C, Davi F, Delfau-Larue MH, Kneba M, van Dongen JJ, Beldjord K, Molina TJ. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. Leukemia. 2007 Feb;21(2):215-21. Epub 2006 Dec 14.
3. Evans PA, Pott Ch, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, Garcia JF, van Krieken JH, Pals S, Kluin P, Schuuring E, Spaargaren M, Boone E, González D, Martinez B, Villuendas R, Gameiro P, Diss TC, Mills K, Morgan GJ, Carter GI, Milner BJ, Pearson D, Hummel M, Jung W, Ott M, Canioni D, Beldjord K, Bastard C, Delfau-Larue MH, van Dongen JJ, Molina TJ, Cabeçadas J. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. Leukemia. 2007 Feb;21(2):207-14. Epub 2006 Dec 14.
4. F Grange, M D'Incan, N Ortonne, S Dalac, L Laroche, M Beylot-Barry, M. Delfau-Larue, B Vergier, M Bagot. pour le Groupe Français d'Etude des Lymphomes Cutanés. Prise en charge des lymphomes B cutanés : Recommandations du Groupe Français d'Etude des Lymphomes Cutanés. Management of Cutaneous B-cell Lymphoma : French Study Group on Cutaneous Lymphoma consensus recommendations. (Annales de Dermatologie et de Vénérérologie, sous presse)
5. Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, Schuuring E, Al Saati T, van Dongen JJ, van Krieken JH. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive

lymphoproliferations usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.

Leukemia. 2007 Feb;21(2):222-9. Epub 2006 Dec 14.

Recommandations de juste prescription RUBIH Réseau de Biologie Innovatrice en Onco-Hématologie /GBMHM /GELA/GOELAM 2009, publiées dans Hématologie, 2010, sous presse.

6. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuuring E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droege J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2257-317. Review.

### Auteurs

• Rédacteurs V1 : Th Molina, R Delarue, JM Cayuela, F Davi	le 15/07/2010
• Relecteurs : M. Bagot, P. Ballerini, MH. Delfau-Larue, V. Leblond, E. Macintyre, C. Guettier, JF Fléjou	le 26/08/2010
• Validation Comité de Coordination	le 06/10/2010