

**GROUPE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
ALBERT CHENEVIER - HENRI MONDOR**

51 AVENUE DU MARECHAL DE LATTRE DE TASSIGNY - 94010 CRETEIL Cedex

Contact : DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE, tel secrétariat : 01 49 81 27 28
Pr Karen LEROY (Oncologie Moléculaire), Dr Marie-Luce AURIAULT (Pathologie Digestive)

BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE :

PATIENT (ou étiquette à coller)	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
Nom :	Née :	
Prénom :	Date de naissance :	

PATHOLOGISTE DEMANDEUR

NOM :
ADRESSE:.....

EXAMEN DEMANDE : RECHERCHE D'INSTABILITE MICROSATELLITE

MOTIF DE LA DEMANDE : Dépistage syndrome de Lynch (HNPCC) Stratégie thérapeutique
 Autre :

DATE DE LA DEMANDE :

MATERIEL TRANSMIS : DOUBLE DU COMPTE-RENDU ET LAME HES A JOINDRE A LA DEMANDE

FIXATEUR UTILISE* : Formol Formol neutre DAFNA Autres (préciser): * PAS DE BOUIN
Type de prélèvement : Cytologie Biopsie Pièce opératoire
Site du prélèvement (organe) : Diagnostic histologique :
Référence Laboratoire : Date du prélèvement :
Nature (coupes, blocs, lames....) :

PRECISER DANS LA ZONE SELECTIONNEE POUR ANALYSE (prélèvement le plus tumoral possible)

% de noyaux de cellules tumorales :
Commentaire (nécrose, fibrose, substance colloïde....) :

CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises) : ORDONNANCE A JOINDRE

Nom :
Adresse :

RECOMMANDATIONS DE TRANSPORT ET DELAI DE RENDU DE RESULTAT :

Sélectionner si possible un bloc comportant à la fois une zone tumorale et une zone de muqueuse NON tumorale ou joindre un deuxième bloc NON tumoral.

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

HOPITAL HENRI MONDOR 51, AVENUE DU MARECHAL DE LATTRE DE TASSIGNY, 94010 CRETEIL CEDEX

DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE (Pr ES ZAFRANI)

CONTACTS : Pr Karen LEROY (oncologie moléculaire), Dr Marie-Luce AURIAULT (pathologie digestive)

TEL SECRETARIAT : 01 49 81 27 28 / Fax : 01 49 81 27 33

Informations pratiques concernant la recherche d'instabilité microsatellite dans les adénocarcinomes du colon

Pour quels patients :

- Patient atteint de cancer colorectal avant l'âge de 60 ans
- Patient ayant un antécédent personnel ou familial au 1^{er} degré de cancer colorectal, de l'endomètre, de l'intestin grêle ou des voies urinaires excrétrices

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Colon - Endomètre / Adénocarcinome - phénotype MSI » de l'AP-HP.

Dans quels buts :

Identifier les sujets susceptibles d'être atteints d'un syndrome de Lynch (HNPCC) et devant bénéficier d'une consultation d'oncogénétique

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Colon - Endomètre / Adénocarcinome - phénotype MSI » de l'AP-HP.

Sur quels prélèvements :

- Tumeur primitive ou localisation métastatique fixée (préférentiellement formol, le liquide de Bouin est formellement exclu) et incluse en paraffine. Le prélèvement doit comporter **plus de 30% (idéalement plus de 50%) de cellules tumorales** (par rapport au nombre total de cellules) **dans la zone analysée** (éventuellement après macro-dissection). Cette évaluation peut être faite par le médecin anatomo-pathologiste demandeur et précisée sur le bon de commande. A défaut, cette évaluation sera faite par le Dr Marie-Luce Auriault ou son remplaçant.
- Du **tissu non-tumoral (muqueuse digestive)** est souhaitable pour l'analyse: bloc comportant deux zones distinctes, tumorales et non-tumorales, ou bloc supplémentaire

Que faut-il envoyer :

- le bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales (par rapport aux cellules totales de l'échantillon) avec 1 lame HES correspondante et si possible 1 bloc non-tumoral
- le **compte rendu d'examen** anatomo-pathologique correspondant au prélèvement
- le bon de demande d'examen (téléchargeable sur le site) dûment rempli, comportant notamment les **coordonnées complètes du clinicien demandeur** pour une transmission optimale des résultats.
- la fiche de dédommagement pour désarchivage, le cas échéant.

Où adresser sa demande (courrier médical urgent mentionné sur l'enveloppe)

Référent : Pr Karen Leroy
Laboratoire : Hôpital Henri Mondor,
Département de Pathologie (RDC haut)
51 av du Mal de Lattre de Tassigny
94010 CRETEIL Cedex
Réception : 01 49 81 27 28 ou 27 32

- Le prélèvement sera enregistré dans le logiciel de gestion du laboratoire par le secrétariat.
- Le prélèvement reçu et les documents associés sont validés pour l'analyse moléculaire par le Dr Marie-Luce Auriault (marie-luce.auriault@hmn.aphp.fr) ou son remplaçant
- Les coupes de tissus, après macrodissection éventuelle, sont préparées pour l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation, dans le secteur de Biologie Moléculaire du Département de pathologie, sous la responsabilité du Pr Karen Leroy (karen.leroy@hmn.aphp.fr)

Quelles techniques d'analyse utilisons-nous ?

- - Après analyse de la lame HES pour sélectionner une zone suffisamment tumorale, le bloc est coupé (avec ou sans macro-dissection) sur un microtome au niveau de la zone tumorale et de la zone non-tumorale : 5 à 10 coupes de 10µm sont réalisées et transférées dans un tube identifié.
- - l'extraction de l'ADN est réalisée à partir des coupes tissulaires à l'aide d'un robot (EZ1, QIAgen) avec des barettes de réactifs prêtes à l'emploi, selon un protocole standardisé. L'ADN est ensuite dosé en spectrophotométrie.
- - la recherche d'instabilité micro-satellite est faite par amplification de l'ADN tumoral en PCR fluorescente au niveau de 5 marqueurs mononucléotidiques monomorphes (Bat25, Bat26, NR21, NR22 et NR24) selon la technique décrite par R Hamelin (Suraweera N et al, Gastroenterology 2002, 123: 1804-1811).
 - Si le profil d'amplification observé est douteux, on s'aidera d'une analyse parallèle de l'ADN non-tumoral provenant du même patient pour déterminer si les microsatellites sont stables (phénotype MSS) ou instables à haut niveau (phénotype MSI ou RER+)
 - Dans les cas limites, une analyse est réalisée à l'aide d'un kit MSI commercialisé afin de confirmer/d'infirmer les résultats obtenus.
- - Si le prélèvement analysé présente un phénotype MSI en biologie moléculaire (ou si l'ADN extrait du prélèvement n'est pas de qualité suffisante pour permettre cette analyse), la recherche d'une perte d'expression des protéines MLH1, MSH2 et MSH6 impliquées dans le Mismatch Repair, est réalisée en immunohistochimie.
 - Cette deuxième technique permet de confirmer les résultats de la biologie moléculaire et d'orienter les analyses moléculaires secondaires dans le cas de syndrome de Lynch.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

- A partir de la réception du prélèvement en anatomie pathologique, un délai maximum de 15 jours est à prévoir. Le résultat est adressé aux correspondants cliniciens dont les coordonnées sont précisées dans le Bon de demande d'examen. Le résultat est co-signé par les référents anatomo-pathologistes et biologistes moléculaires.
- En cas de situation d'urgence, la mention URGENT sur le Bon de demande d'examen permet de réduire le délai de rendu au maximum.
- Le bloc tumoral vous sera réadressé avec le résultat, sauf mention contraire (analyses complémentaires en cours).

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Côlon / Endomètre /Adénocarcinome	<i>Phénotype MSI</i>

But : Identification des sujets atteints d'un syndrome de Lynch

Identifier les patients atteints d'un cancer colorectal ou d'un cancer de l'endomètre avec instabilité microsatellitaire, afin d'identifier les sujets susceptibles d'être atteints d'un syndrome de Lynch (ou syndrome HNPCC) et devant bénéficier d'une consultation d'oncogénétique.

Indications

Analyse nécessaire (Expertise collective) : tous les patients atteints d'un cancer colorectal âgés de moins de 60 ans, les patients ayant un antécédent au 1er degré d'une tumeur du spectre étroit du syndrome de Lynch (cancer de l'endomètre, de l'intestin grêle, des voies urinaires excrétrices) quelque soit l'âge, et tous les patients ayant développé deux tumeurs du spectre étroit.

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.

- Prélèvements tumoraux (pièce opératoire ou biopsie), primitif ou métastase
- De préférence sur blocs de tumeur fixée en formol tamponné pendant moins de 48h.
- Contrôle histologique indispensable de la cellularité de l'échantillon tumoral.
- Macrodissection sur lame nécessaire si <20% de cellules tumorales (Le compte rendu doit indiquer le % de cellules tumorales présentes sur la lame sur laquelle la macrodissection a été réalisée).

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).

Deux techniques sont possibles :

1. Une technique de biologie moléculaire qui teste 5 marqueurs quasi mononomorphes dans la population générale. Il s'agit d'une amplification par PCR de 5 marqueurs, le produit d'amplification est révélé par une électrophorèse. Le résultat est positif si au moins 3 des 5 marqueurs présentent une instabilité génétique.
2. Une technique immunohistochimique qui teste la perte d'expression des 4 protéines de la réparation des mésappariements de l'ADN impliquées dans la survenue du syndrome de LYNCH (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) : une perte d'expression par les cellules tumorales d'au moins une de ces protéines indique la positivité du phénotype.

La place respective de ces deux tests reste discutée. Les deux techniques ont des limitations (faux négatifs) qui nécessitent une analyse critique en cas de discordance entre une histoire clinique personnelle ou familiale évocatrice d'un syndrome de prédisposition et un résultat négatif par l'une des techniques.

Délai moyen de rendu de résultat

30 jours

Informations complémentaires

Références (sur les indications et les techniques)

1. Olschwang et al. Identification et prise en charge du syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colon cancer), Prédisposition héréditaire aux cancers du côlon, du rectum et de l'utérus. Bull Cancer 2004 ; 91 (4) : 303-15
2. Vasen et al. Recommendations to improve identification of hereditary and familial cancer in Europe. Fam Cancer 2010;9:109-15

Auteurs

- | | |
|--|---------------|
| • Rédacteurs V1 : P. Laurent-Puig, JF. Flejou, Y. Parc | le 15/06/2010 |
| • Relecteurs : S. Chaussade | le 18/08/2010 |
| • Validation Comité de Coordination | le 06/10/2010 |