

BON DE TRANSPORT ET DE DEMANDE D'EXAMEN DE PATHOLOGIE MOLECULAIRE

Hôpital Universitaire Ambroise Paré
9 Avenue Charles de Gaulle – 92104 Boulogne Cedex

Service de Pathologie - Chef de Service : Pr J.F. Emile – Tel secrétariat : 01 49 09 57 28

PATIENT

Nom d'usage :	Nom de naissance :
Prénom :	Date de naissance :
Sexe : <input type="checkbox"/> Féminin <input type="checkbox"/> Masculin	

EXPEDITEUR / CORRESPONDANTS

Pathogiste (<i>Nom, prénom, adresse, email, téléphone</i>) :	Clinicien référent (<i>Nom, prénom, adresse, email, téléphone</i>):
---	--

MATERIEL TRANSMIS

<u>Référence dans le labo d'origine</u> :	<u>Localisation primitive</u> :
<u>Nature de l'échantillon</u> :	<input type="checkbox"/> Tumeur primitive <input type="checkbox"/> Métastase
<input type="checkbox"/> Bloc(s) paraffine (recommandé) Nombre : _____	<input type="checkbox"/> Tissu non tumoral
<input type="checkbox"/> Bloc congelé	<u>Prélèvement</u> :
<input type="checkbox"/> Autre (Préciser) : _____	<input type="checkbox"/> Pièce opératoire <input type="checkbox"/> Biopsie
	<input type="checkbox"/> Cytologie

ANALYSE DEMANDEE

<input type="checkbox"/> KRAS / NRAS	<input type="checkbox"/> KIT	<input type="checkbox"/> MSI
<input type="checkbox"/> BRAF	<input type="checkbox"/> PDGFRA	<input type="checkbox"/> MDM2 (FISH)
<input type="checkbox"/> NRAS	<input type="checkbox"/> EGFR	<input type="checkbox"/> Darier-Farrand (FISH)
<input type="checkbox"/> CTNNB1		

TRANPORTEUR

Date de départ :	<u>Température de transport</u> :
<input type="checkbox"/> Poste. Préciser le type d'envoi :	<input type="checkbox"/> Température ambiante
<input type="checkbox"/> Autre. Préciser :	<input type="checkbox"/> Dans la glace
	<input type="checkbox"/> Carboglace

RECEPTION

Date de réception :
<input type="checkbox"/> Conforme aux indications de l'expéditeur
<input type="checkbox"/> Non conforme aux indications de l'expéditeur. Préciser :
Visa :

Hôpital Universitaire Ambroise Paré

9 Avenue Charles de Gaulle – 92104 Boulogne Cedex

Service de Pathologie - Chef de Service : Pr J.F. Emile – Tel secrétariat : 01 49 09 57 28

**FICHE D'INFORMATION CONCERNANT LES ANALYSES EN PATHOLOGIE
MOLECULAIRE A L'HOPITAL AMBROISE PARE**

Quelles analyses :

Les analyses réalisées en routine à l'hôpital Ambroise Paré :

- **Adénocarcinomes colorectaux :** 1) instabilité des microsatellites
- **Tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) :** 2) mutations KRAS, NRAS et BRAF
- **Mélanomes :** mutations de KIT et PDGFRA
- **Histiocytoses :** mutations BRAF, NRAS et KIT
- **Sarcomes (techniques de FISH) :** mutations de BRAF, NRAS et MAP2K1
- **Tumeurs desmoïde :** amplification de MDM2, t(17,22)
- **Carcinomes pulmonaires non à petites cellules :** mutation de CTNNB1
 - Recherche des mutations KRAS et BRAF, et typage moléculaire par Séquençage Nouvelle Génération (en collaboration avec HEGP).
 - Recherche par immunohistochimie du réarrangement ALK.

Pour toute autre demande d'analyse, nous contacter au préalable.

Pour quels patients et dans quels buts :

Les indications sont détaillées dans les fiches médicales correspondantes disponibles sur le site Oncomolpath.

Sur quels prélèvements :

- Tumeur primitive ou métastatique.
- Prélèvement tissulaire fixé (préférentiellement formol tamponné) et inclus en paraffine.
- Le prélèvement doit être aussi riche que possible en cellules tumorales.

Où adresser sa demande :

Service de pathologie - Pathologie Moléculaire - Hôpital Ambroise Paré

Adresse indiquée sur le bordereau de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)

Contacts privilégiés indiqués à la fin du présent document.

Que faut-il envoyer :

Comme indiqué sur le bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>), l'échantillon à analyser doit être :

- Bloc(s) d'inclusion en paraffine* + 1 lame HES ayant servie au diagnostic notamment pour les biopsies (En cas d'échec, un bloc congelé pourra être demandé)

* Pour le statut MSI, envoyer 1 bloc comportant tissu tumoral et muqueuse normale ou 2 blocs (1 tumoral et l'autre muqueuse normale)

Pour tout autre type d'échantillon, nous contacter au préalable.

Toujours joindre à l'échantillon :

- bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)
- Une copie du compte rendu (CR) original d'anatomie pathologique qui peut dispenser de remplir certaines rubriques du bon de demande d'examen si elles sont présentes sur le CR.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement, l'un de nos objectifs qualité est de répondre à 90% des demandes dans un délais de 21 jours (maximum 28 jours selon les recommandations de l'INCa). Le résultat est adressé aux pathologistes et aux correspondants qui sont mentionnés dans le bon de transport et demande d'examen.

En cas de situation d'urgence, la mention **URGENT** doit être ajoutée sur le bon de transport et de demande d'examen pour de réduire au maximum le délai de rendu.

Quelles techniques utilisons-nous ?

Contrôle histologique :

Sur coupe 4 µm colorée à l'HES. Validation du diagnostic histologique. Evaluation du pourcentage de cellules tumorales. Sélection, si besoin, de la zone tumorale à macro-disséquer ou à prélever sélectivement sur le bloc.

Macro-dissection / prélèvement sélectif : (Pour les analyses « en tube » uniquement)

Pour tout échantillon fixé dont le pourcentage estimé de cellules tumorales est inférieur à 50% et qui peut être augmenté par macro-dissection. Dans un environnement confiné, si besoin sous contrôle à la loupe binoculaire.

Extraction de l'ADN : (Pour les analyses « en tube » uniquement)

Digestion en protéinase K sous agitation constante à 56°, puis KIT Qiagen®

Analyses « en tube »

- Mutations de *KRAS* et *BRAF* pour tumeurs colorectales : Discrimination allélique par PCR temps réel. Recherche des mutations G12S, G12R, G12C, G12D, G12A G12V et G13D de *KRAS* et V600E/K de *BRAF* uniquement. Sensibilité de 5% à 10%. En cas de négativité, analyse par séquençage sanger ciblée sur les codons 12, 13, 61, 117, 146 de *KRAS* et *NRAS*.
- Mutations de *BRAF* et *NRAS* pour tumeurs mélanocytaires et histiocytaires : Pyroséquençage ciblant les codons 600 de *BRAF* et 61 de *NRAS*, puis séquençage Sanger des codons 12 et 13 de *NRAS* si pas de mutations.
- Mutation de *MAP2K1* pour tumeurs histiocytaires : Analyse de taille des amplicons (LAPP) des exons 2 et 3, et séquençage Sanger.
- Mutations de *CTNNB1* pour tumeurs desmoïdes : Pyroséquençage ciblant les codons 41 et 45
- Mutations de *KIT* pour suspicion de GIST ou mélanome : Analyse des exons 9, 11, 13 et 17 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de *PDGFRA* pour suspicion de GIST : Analyse des exons 12, 14 et 18 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de l'*EGFR* : discrimination allélique + sonde PNA pour les substitutions L858R et T790M (sensibilité de 5%). Analyse de fragment pour les délétions de l'exon 19 et les insertions de l'exon 20 (sensibilité de 10%). En cas de négativité, séquençage pour les codons 719 à 986 (sensibilité de 30%).

En collaboration avec le service de Biochimie de l'hôpital Européen George Pompidou

- Statut MSI / Recherche d'un déficit du système de réparation des mésappariements (système MMR) : Analyse de la taille de fragment des microsatellites BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27. En collaboration avec le service de Biochimie et Génétique Moléculaire de notre pôle.

Analyses *in situ* :

- Statut MSI / Déficit en réparation de l'ADN (MMR) : Immunohistochimie avec les Anti- MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6 (clones G168-728, A16-4, FE11 et 44/MSH6) sur automate Bond-Max.
- Statut BRAF : Immunohistochimie avec l'anti-BRAF VE1 sur automate Bond-Max.
- Amplification de MDM2 : FISH
- Translocation t(17;22) dans les dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand : FISH

Contacts :

- Carcinome colorectal : Statut MSI / Recherche d'un déficit du système MMR :
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28
Courriel: catherine.julie@aphp.fr
- Carcinome colorectal : Mutations de *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- GIST : Mutations de *KIT* et *PDGFRA* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Mélanome : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *KIT* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Carcinome bronchopulmonaire : Mutations de l'*EGFR* :
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28
Courriel: catherine.julie@aphp.fr
Dr Hélène Blons service de Biochimie, HEGP, tél: 01 56 09 39 35
Courriel: helene.blons@aphp.fr
- Amplification MDM2 et translocations t(17, 22) :
Dr Cristi Marin, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 27 / 28
Dr Ute Zimmermann, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 24 / 28
Dr Z Hélias-Rodzewicz, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 56 88
Courriel: cristi.marin@aphp.fr
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr

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