

**GROUPE HOSPITALIER COCHIN – HOTEL DIEU – ST VINCENT DE PAUL -  
BROCA  
SITE HOTEL-DIEU**

1 place du Parvis Notre Dame, 75004 Paris

Contact : Pr T. MOLINA, SERVICE DE PATHOLOGIE Hôpital Hôtel-Dieu- Tel secrétariat : 01 42 34 82 82

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

PATIENT	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
Nom :	Née :	
Prénom :	Date de naissance :	

**PATHOLOGISTE DEMANDEUR**

NOM : .....

ADRESSE : .....

**EXAMEN DEMANDE : CLONALITE LYMPHOÏDE**

CONTEXTE DE LA DEMANDE : .....

DATE DE LA DEMANDE : .....

**MATERIEL TRANSMIS**

**TISSU CONGELE**

TISSU FIXE, FIXATEUR\*: DUREE DE FIXATION :

RNA LATER :

Diagnostic anatomo-pathologique : (ou double compte-rendu) :

Référence Laboratoire : .....

Date du prélèvement : .....

Nature (coupes, blocs, lames....) : .....

\* PAS DE BOUIN

**PRECISER DANS LA ZONE SELECTIONNEE POUR ANALYSE**

Matériel cellulaire représentatif de la lésion et non nécrosé :  OUI  NON

Pathologiste validant l'analyse morphologique : .....

**CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises)**

Nom : .....

Adresse : .....

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

14 jours

## FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

### GROUPE HOSPITALIER COCHIN - HOTEL DIEU - ST VINCENT DE PAUL - BROCA SITE HOTEL-DIEU

1 PLACE DU PARVIS NOTRE DAME, 75004 PARIS

Contact : SERVICE DE PATHOLOGIE : Pr TJ MOLINA - Tel secrétariat : 01 42 34 82 82

### Informations pratiques concernant l'analyse de la clonalité IgH/TCR dans les lymphomes (y compris cutanés) à l'Hôtel-Dieu

#### 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 clonale 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 :

Tumeur primitive congélée (ganglion, peau, etc....). Sang ou moelle en cas de suspicion d'envahissement.

Le prélèvement transmis doit être infiltré par les cellules lymphoïdes suspectes. Son degré d'infiltration doit être indiqué dans la fiche de prescription pour une interprétation pertinente des résultats.

Un compte rendu d'analyse histologique doit impérativement accompagner la prescription.

#### Où adresser sa demande :

Votre demande sera traitée à l'Hôtel-Dieu dans le service de pathologie

**Responsable de l'activité :** Pr Th MOLINA -Tél : 01 42 34 27 86

**Personnes à contacter :** Francis Devez ou Véronique Ducruet (technicien) - Tél : 0142342786

**Laboratoire :** Hôtel-Dieu

Service de Pathologie (A3 1er étage)

1 place du Parvis Notre Dame

75004 Paris

*Il est souhaitable, si le pathologiste demandeur ne fait pas partie du réseau lymphopath de l'INCa, d'envoyer au laboratoire en même temps que l'échantillon un bloc tissulaire fixé et inclus en paraffine afin de valider l'indication.*

#### Que faut-il envoyer :

→ Au service de pathologie:

- le prélèvement tissulaire ou cellulaire
- le compte rendu d'anatomo-pathologie correspondant au prélèvement
- 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.

Nous acceptons :

- bloc fixé et inclus en paraffine
- ou coupes fixées (2 à 5 coupes de 10 microns) ou 2 cylindres de TMA de 0.6 mm) + 1HES

Merci de préciser Fixateur et Durée de fixation pour les prélèvements fixés.

- bloc congelé
- coupes tissulaires congelées (2 à 5 coupes de 10 microns) + 1 HES coupe congelée
- ADN extrait, Tissu congelé ou fixé fixateur : Concentration : DO :
- cellules fraîches (ascite, plèvre, LCR...), de sang ou de moelle recueillis sur tube EDTA (1 à 2 tubes de 5 ml).
- Tissu dans RNAlater

#### **Recommandations de transport**

- Le laboratoire est ouvert de 8h à 18h du lundi au vendredi et le samedi de 9h à 12h.
- Les tissus fixés, l'ADN extrait et le tissu dans le RNAlater peuvent être adressés par voie postale sans condition de transport particulière.
- Les blocs congelés ou coupes tissulaires congelées doivent être adressées sur de la carboglace ou dans de l'azote liquide si possible après avoir **contacté le technicien au 01 42 34 27 86 ou nous avoir prévenu par le site web.**

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

A partir de la réception du prélèvement en anatomie pathologique, 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 ?**

- l'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.
- la recherche d'un réarrangement clonal des gènes IGH ou TCR $\gamma$  est réalisée en fonction des indications par amplification par PCR des jonctions V-(D)-J, utilisant le protocole Biomed-2 et analyse des heteroduplex sur polyacrylamide.
- la recherche d'un réarrangement clonal des autres gènes IG et TCR ne sera entreprise que dans un second temps.
- la sensibilité de ces techniques est comprise entre 1 et 10%.

## 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, MH. Delfau-Larue ,M. D'Incan, F. Grange, N. Ortonne, JP. 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, JasaniB, 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, DaviF, 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, vanKrieken JH, Pals S, Kluij 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, MH 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