

**GROUPE HOSPITALIER NECKER - ENFANTS MALADES
LABORATOIRE CENTRAL D'HEMATOLOGIE**

Tour Pasteur - 2ème étage - 149, rue de Sèvres - 75743 PARIS Cedex 15

Contacts :

Pr. E.MACINTYRE 01 44 49 49 47 (elizabeth.macintyre@nck.aphp.fr) Secrétariat:01 44 49 49 42/Fax:01 44 38 16 21
Dr. V.ASNAFI 01 44 49 49 24 (vahid.asnafi@nck.aphp.fr)
Dr. C.CALLENS 01 44 49 49 41 (celine.callens@nck.aphp.fr)

BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE

PATIENT	☐ Monsieur	☐ Madame
Nom :	Née :	
Prénom :	Date de naissance :	

DEMANDEUR

NOM :
SERVICE :
ADRESSE:.....

EXAMEN DEMANDE :
DATE DE PRELEVEMENT :
CONTEXTE DE LA DEMANDE :
DATE DE LA DEMANDE :
PROTOCOLE :
TRAITEMENT :

MATERIEL TRANSMIS

Echantillon de Diagnostic : ☐ rechute : ☐ Suivi : ☐
SANG : ☐ Moelle : ☐
TISSU :
FIXATEUR UTILISE** : DUREE DE FIXATION :
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

% de noyaux de cellules tumorales :
% de noyaux de cellules non tumorales :
% superficie de plages acellulaires colloïde : nécrose : fibrose :
Pathologiste validant l'analyse morphologique :

GROUPE HOSPITALIER NECKER - ENFANTS MALADES
LABORATOIRE CENTRAL D'HEMATOLOGIE
Tour Pasteur - 2ème étage - 149, rue de Sèvres - 75743 PARIS Cedex 15

Contacts :

Pr. E.MACINTYRE 01 44 49 49 47 (elizabeth.macintyre@nck.aphp.fr) Secrétariat:01 44 49 49 42/Fax:01 44 38 16 21
Dr. V.ASNAFI 01 44 49 49 24 (vahid.asnafi@nck.aphp.fr)
Dr. C.CALLENS 01 44 49 49 41 (celine.callens@nck.aphp.fr)

CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises)

Nom :

Adresse :

RECOMMANDATIONS DE TRANSPORT ET DELAI DE RENDU DE RESULTAT

Prélèvements sur EDTA; (minimums : 20 ml de sang et/ou 1 à 2 ml de moelle).

Le prélèvement doit parvenir au laboratoire sous 24 h et avant 14 h le vendredi et veille de fêtes.

Pour tout service extérieur à l'AP-HP : BON DE COMMANDE OBLIGATOIRE

* A leur convenance, les laboratoires peuvent rajouter ici (à la suite) des Items spécifiques à leur laboratoire.

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

GROUPE HOSPITALIER NECKER - ENFANTS MALADES LABORATOIRE CENTRAL D'HEMATOLOGIE

Tour Pasteur - 2ème étage - 149, rue de Sèvres - 75743 PARIS Cedex 15

Contacts :

Pr. E.MACINTYRE 01 44 49 49 47 (elizabeth.macintyre@nck.aphp.fr) Secrétariat : 01 44 49 49 42/Fax : 01 44 38 16 21
Dr. V.ASNAFI 01 44 49 49 24 (vahid.asnafi@nck.aphp.fr)
Dr. C.CALLENS 01 44 49 49 41 (celine.callens@nck.aphp.fr)

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

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 congelée (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'hôpital NECKER.

➔ Le prélèvement sera initialement réceptionné, validé et préparé pour l'analyse moléculaire par le laboratoire d'Hématologie :

Laboratoire : Service d'Hématologie - Hôpital NECKER
Tour Pasteur - 2ème étage - 149, rue de Sèvres - 75743 PARIS Cedex 15
Réception : 01 44 49 49 37

➔ Le tissu sera stocké et coupé par la tumorotheque puis transmis à son correspondant biologiste moléculaire du laboratoire central d'hématologie qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation.

Référents Secteur Moléculaire :

Pr MACINTYRE Elizabeth	elizabeth.macintyre@nck.aphp.fr	Sec : 01 44 49 49 42/F : 01 44 38 16 21
Dr CALLENS Céline	celine.callens@nck.aphp.fr	tel : 01 44 49 49 41
Dr ASNAFI Vahid	vahid.asnafi@nck.aphp.fr	tel : 01 44 49 49 24

Que faut-il envoyer :

- le prélèvement tissulaire congelé et/ou les prélèvements de sang et de moelle
- 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.
- les résultats des analyses morphologiques et immunophénotypiques.

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 ?

- le tissu congelé sera coupé par la Tumorotheque de Necker puis
- 20 coupes de 20µm seront réalisées et transmises au laboratoire central d'hématologie.
- l'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.
- la recherche d'un réarrangement clonal des gènes IGH et/ou TCRγ est réalisée, en fonction de la question posée, par amplification par PCR des jonctions V-(D)-J.
- les produits PCR sont analysés par genescan (IgH) ou par genescan et hétéroduplex (TCR)
- la recherche d'un réarrangement clonal des autres gènes IG et TCR ne sera entreprise que dans un second temps et après entente avec les biologistes référents.
- la sensibilité de ces techniques est comprise entre 1 et 10%.

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Lymphome (y compris cutané)	Clonalité IgH/TCR

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'hématologiste 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 amorces 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 Vénéréologie, 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 C, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, Garcia JF, van Krieken JH, Pals S, Kluin P, Schuurink E, Spaargaren M, Boone E, González D, Martínez 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 Vénéréologie, sous presse)
5. Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, Schuurink E, Al Saati T, van Dongen JJ, van Krieken JH.
Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive

lymphoproliférations 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, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese 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 |