

MANUEL DE PRELEVEMENTS spécifique examens de Biopathologie moléculaire



**Cabinet d'anatomie
et cytologie pathologiques
partenaire des établissements de soins**

Table des Matières

1 Objet et domaine d'application.....	3
2 Définitions et références.....	3
3 Présentation de la plateforme.....	3
4 Modalités de prise en charge de l'examen de Biopathologie Moléculaire.....	4
4.1 Prérequis liés au prélèvement.....	4
4.1.1 Fixation des prélèvements.....	4
4.1.2 Sélection du matériel.....	4
4.2 Formalisation de la demande d'examen.....	5
4.2.1 Demandes d'examens.....	5
4.2.2 Compte-rendu anatomopathologique.....	5
4.3 Expédition.....	5
4.3.1 Préparation de la documentation associée.....	5
4.3.2 Conditionnement du matériel : Tissu.....	5
4.3.3 Conditionnement et recueil : Biopsies liquides.....	6
4.3.4 Fiche de liaison (Traçabilité).....	6
4.3.5 Envoi de votre demande.....	7
4.4 Analyses réalisées.....	13
4.4.1 Biopathologie moléculaire.....	13
4.4.2 Hybridation in situ par FISH.....	15
4.5 Réexpédition.....	15

MEDIPATH

1 | Objet et domaine d'application

[Sommaire](#)

Ce document définit les modalités de prise en charge des examens de Biopathologie moléculaire : prescription de la demande d'examen, conditions de prélèvement, de préparation et d'acheminement des échantillons sur notre plateforme, transmission des résultats. Des informations concernant les analyses et le fonctionnement de notre plateforme vous sont également communiqués dans ce document.

2 | Définitions et références

[Sommaire](#)

Sans objet.

3 | Présentation de la plateforme

[Sommaire](#)

Contact principal pour le traitement des demandes

MEDIPATH Montpellier	Examens pris en charge	
Service de Biopathologie Moléculaire 80 rue Pythagore 34170 CASTELNAU-LE-LEZ	<ul style="list-style-type: none"> ■ NGS Panel ADN et ARN (réarrangements) ■ NGS BRCA1/BRCA2 ■ NGS Biopsie liquide 	<ul style="list-style-type: none"> ■ PCR Temps réel ■ MSI ■ PCR Signature génomique Sein
Tél. 04 99 13 62 37 (secrétariat)	Contact secrétariat : Géraldine MALBRANQUE et Karima MERSALI secretariat.biopathologie@medipath.fr	
Tél. 04 99 13 62 36 (technique)	Contact technique: Sophie MANZ - Estelle LESBROS – Anthony MANDON – Laurène HERIAUD – Loris CARANTA biopathologie@medipath.fr	

Afin d'optimiser le circuit du prélèvement et donc le délai de rendu, l'ensemble des plateaux techniques de Médipath participent à la prise en charge des demandes.

4 | Modalités de prise en charge de l'examen de Biopathologie Moléculaire

4.1 | Prérequis liés au prélèvement

[Sommaire](#)

4.1.1 | Fixation des prélèvements

Fixateur recommandé : le formol tamponné 10% (4% formaldéhyde). Le temps de fixation optimal est compris entre 24h et 48h.

Fixateurs proscrits : Liquide de Bouin, l'acide picrique, l'éosine, ainsi que les décalcifiants. Les prélèvements osseux ne doivent pas subir d'étape de décalcification à base d'acide (EDTA recommandé).

Fixateurs déconseillés : Fixateurs à base d'alcool, l'AFA (alcool/formol/acide acétique) ou substituts de formol.

4.1.2 | Sélection du matériel

Un bloc suffisamment riche en matériel tumoral doit être sélectionné par un contrôle morphologique microscopique sur lame après coloration standard (Hématoxyline/Eosine +/- Safran) réalisé par un pathologiste.

Une sélection de la région du prélèvement la plus riche en cellules tumorales et comportant le moins de nécrose possible doit être réalisée.

Dans ce cadre, il est préférable de réaliser une macrodissection pour les prélèvements contenant moins de 50% de cellules tumorales¹.

En cas de macrodissection, la zone d'intérêt extraite est réincluse en paraffine. Le bloc produit doit porter le numéro de dossier « Patient » ainsi que la mention « BIOMOL ».



Afin de réduire le risque de contaminations inter-prélèvements, des précautions dans les manipulations techniques sont à prévoir :

- Travailler avec des instruments nettoyés ;
- Porter des gants sans talc ;
- Utiliser une lame de scalpel neuve pour chaque dossier traité.
- Jeter la première section

Note : en raison de la rareté des échantillons et de la difficulté à reprélever un patient, il est préconisé d'accepter les échantillons ne remplissant pas les critères de qualification. Dans ce cas, le compte rendu final doit indiquer la nature du problème et les réserves qui en résultent sur l'interprétation des résultats.

¹ Le pourcentage de cellules tumorales correspond à l'estimation de la proportion de cellules tumorales sur l'ensemble des cellules (hors nécrose) présente sur la coupe ou sur la zone de prélèvement qui a été sélectionnée.

% Cellules tumorales minimum requis / techniques

Technique	% min.
NGS	20%
PCR Idylla EGFR	10%
PCR Idylla KRAS/NRAS/BRAF	10%
PCR Idylla BRAF (mélanome)	50%
PCR Idylla MSI	20%
Endopredict	30%

Pour plus de détails se reporter à « Préparation des sections d'échantillons pour examen de Biopathologie moléculaire_ [R08-GÉNÉ-INS-005](#) »

4.2 | Formalisation de la demande d'examen

[Sommaire](#)

4.2.1 | Demandes d'examens

Les demandes doivent être faites en ligne sur le site NetSIG (<https://genomique.medipath.fr/>)

4.2.2 | Compte-rendu anatomopathologique

Un exemplaire du compte-rendu anatomopathologique doit être ajouté à la demande en ligne.

4.3 | Expédition

[Sommaire](#)

4.3.1 | Préparation de la documentation associée

Vos demandes doivent être accompagnées de la demande d'examen, du compte rendu anatomopathologique et éventuellement d'une fiche de transfert (si demande faite sur NetSIG) (cf. 4.3.4).

4.3.2 | Conditionnement du matériel : Tissu

En fonction de la quantité de matériel transmis ce bloc ne sera plus utilisable pour des analyses ultérieures, mais sera dans tous les cas renvoyés à l'expéditeur.

Envoyer le **bloc** accompagné d'une **lame HE/HES en miroir** avec cerclage de la zone tumorale sélectionnée qui permettra de se repérer.

Conditionner le matériel et la documentation associée par patient

Insérer les lames dans un porte-lame, les blocs protégés dans du papier-bulle ou du papier essuie-tout.

Au sein de MEDIPATH : un dossier par pochette zip à placer dans les pochettes de transport inter-sites.

ACP autre que MEDIPATH : un dossier par enveloppe à bulle. Inscrire le numéro de dossier sur l'enveloppe bulle (numéro interne du cabinet expéditeur).

Il ne doit y avoir aucune discordance ni ambiguïté d'identification entre les différents éléments transmis.

4.3.3 | Conditionnement et recueil : Biopsies liquides

Les prélèvements devront être acheminés dans le respect de la réglementation ADR de transport de marchandises présentant un risque infectieux (UN 3373).

Utiliser l'intégralité du kit biopsie liquide fournie par MEDIPATH qui contient les conditions de recueil et d'envoi des biopsies liquides « **Instruction de prélèvements pour biopsie liquide en tube ROCHE_ R08-GÉNÉ-INS-017** »

- Utilisation des tubes Cell-Free
- Etui Blister rigide
- Sachet Safety Bag avec fermeture adhésive et absorbant incorporé
- Sachet Zip avec poche « kangourou » pour insertion de la demande d'examen dûment complétée

Emballage « tertiaire » Chronopost siglé UN 3373 (étiquette fournie avec le kit)

Pour recevoir un kit, lors de la première demande prendre contact avec la plateforme de préférence par téléphone au 04 99 23 32 37 ou par mail à secretariat.biopathologie@medipath.fr

4.3.4 | Fiche de liaison (Traçabilité)

Au sein de MEDIPATH :

Ajouter la feuille de transfert généré par NetSIG lors de l'expédition du prélèvement.

Un même envoi peut contenir une ou plusieurs demandes séparées dans des pochettes zip distinctes.

ACP autre que MEDIPATH :

Ajouter l'ordonnance ou la feuille de transfert généré par NetSIG lors de l'expédition du prélèvement.

Un même envoi peut contenir une ou plusieurs demandes séparées dans des enveloppes-bulles distinctes.

Toutes les demandes effectuées lors d'un même envoi doivent être décrites sur la fiche de liaison : numéro de dossier interne, nombre de bloc et de lames. Le cachet de l'établissement expéditeur doit figurer sur la fiche de liaison.

4.3.5 | Envoi de votre demande

Au sein de MEDIPATH :

La transmission se fait soit par ramassage par notre coursier, soit par CHRONOPOST en l'absence de courses.

ACP autre que MEDIPATH :

En France métropolitaine, l'envoi se fait uniquement par CHRONOPOST. Hors France métropolitaine merci de nous contacter.

MEDIPATH s'est associé à CHRONOPOST pour l'acheminement en J+1 de vos envois vers les plates-formes MEDIPATH.

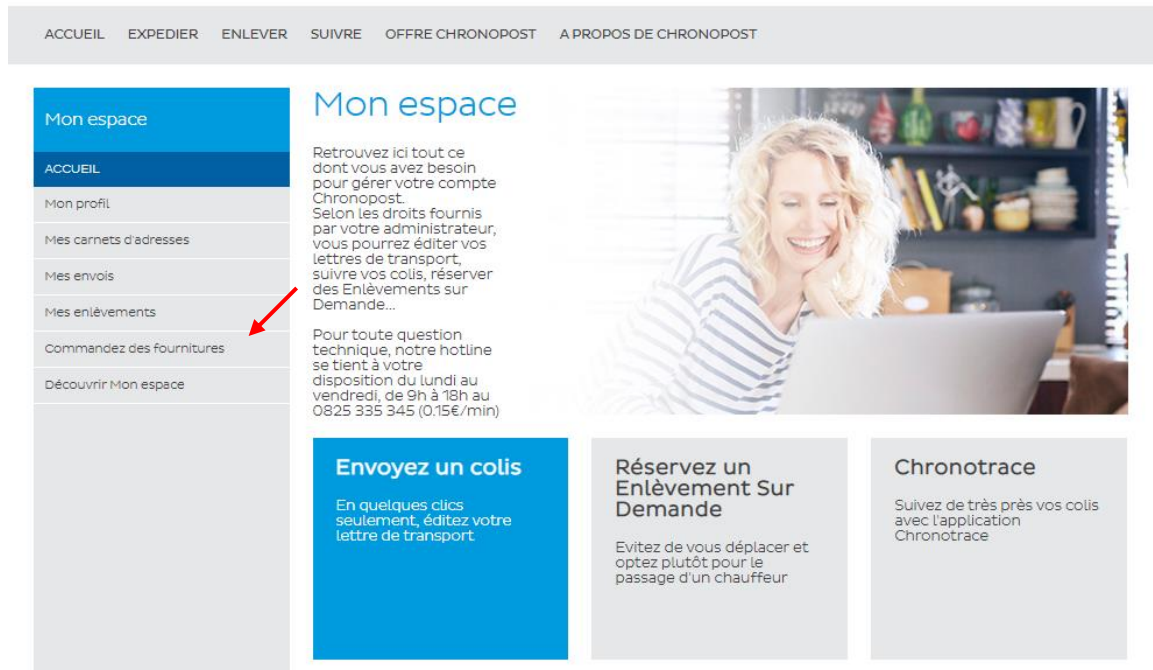
Le préalable à votre première expédition d'une demande d'examen de Biologie Moléculaire est la création par MEDIPATH d'un compte CHRONOPOST au nom de votre cabinet.

Pour créer votre compte, prendre contact par mail : secretariat.biopathologie@medipath.fr

Ce compte vous permettra de commander les fournitures CHRONOPOST nécessaires pour vos envois, d'expédier et de suivre vos colis.

Commander vos fournitures

Sur le site de Chronopost, cliquer sur l'onglet « Commandez des fournitures ».



Puis cliquer sur « Fournitures/Emballages ».



Un formulaire Google s'ouvre.



Entrer le numéro de compte et les information nécessaire.

N° de compte :**26680303**

Cliquer sur Suivant.


Sélectionner vos fournitures en indiquant la quantité souhaitée. Merci de limiter vos commandes aux références suivantes : *ref. 2003, ref. 2070 et ref.2005.*

Carton de 200 enveloppes souples (Pack 1)
Sur-emballage en plastique 33 x 43 cm (réf. 2003)




Sélectionner ▼

Paquet de 25 enveloppes cartonnées 1 kg de documents
Sur-emballage en carton 28 x 36 cm (réf. 2070)



Sélectionner ▼

Paquet de 100 pochettes e-chronopost
A coller sur le colis, pour glisser la lettre de transport informatisée : e-chronopost. (réf. 2005)



Sélectionner ▼

Validez votre commande en cliquant sur « Envoyer ».

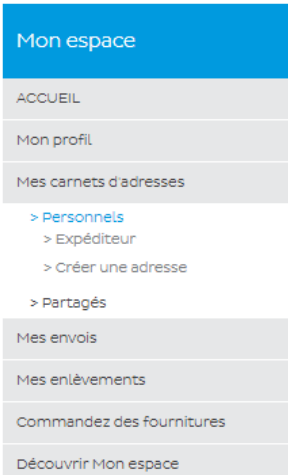
NB : le délai indicatif de livraison des commandes est entre 48h et 72h.

Création d'adresse

Aller dans mon espace, cliquer sur « Mes carnets d'adresses », puis sur « Personnels », puis sur « Créer une adresse ».

Cliquer dans la case d'expéditeur et rentrer vos informations.
Puis valider.

Edition de la lettre de transport



Mon espace

- ACCUEIL
- Mon profil
- Mes carnets d'adresses
 - > Personnels
 - > Expéditeur
 - > Créer une adresse
 - > Partagés
- Mes envois
- Mes enlèvements
- Commandez des fournitures
- Découvrir Mon espace

La lettre de transport doit figurer sur votre colis à destination des plateformes MEDIPATH. Celle-ci comporte toutes les informations (expéditeur, destinataires, code à barre) utiles pour le bon acheminement et la traçabilité de vos envois.

Se connecter sur www.chronopost.fr

Identifiant : votre adresse mail transmise

Avant la première connexion, vous allez recevoir un mail :

Bonjour,

Pour choisir votre nouveau mot de passe, cliquez sur ce lien et laissez vous guider :

[Choisir un nouveau mot de passe](#)

Attention, pour des raisons de sécurité, ce lien ne sera actif que 24 heures.

Nous vous remercions de votre confiance.
chronopost.fr

Créer votre mot de passe et se connecter.



Sélectionner le menu « EXPEDIER ».

Si vous avez plusieurs colis à transmettre, indiquer le nombre de colis transmis.

Pour rappel, un colis peut contenir plusieurs demandes de Biopathologie moléculaire qui sont contenus dans des enveloppes à bulles.

Vous avez plusieurs colis à expédier ?

Indiquez le nombre de colis à expédier :

Vérifier que l'adresse de votre cabinet apparait bien dans la rubrique « expéditeur ».

1 Expéditeur

SELAS MEDIPATH
ANNE CLAURE RIERA
LES JALASSIERES
165 RUE CORINDON
13510 EGUILLES

Recevoir le n° de réservation pour déposer mon colis sans imprimer d'étiquette de transport : ?

Recevoir le suivi de mon envoi par mail Modifier

Cliquer sur modifier si ce n'est pas la bonne adresse et rechercher votre adresse dans la barre de recherche, puis valider.

Vous pouvez cliquer sur recevoir le suivi de mon envoi par mail mais en aucun cas sur la première case.

DESTINATAIRE

3 Destinataire SELAS MEDIPATH - SOPHIE MANZ - 34170 CASTELNAU LE LEZ Rechercher un destinataire ? ^

<p>Type de destinataire * <input checked="" type="radio"/> Professionnel <input type="radio"/> Particulier</p> <p>Raison sociale * <input type="text" value="SELAS MEDIPATH"/></p> <p>Nom * <input type="text" value="MANZ"/></p> <p>Prénom <input type="text" value="SOPHIE"/></p> <p>Téléphone (mobile de préférence) * <input type="text" value="0499233280"/></p> <p>E-mail * <input type="text" value="s.manz@medipath.fr"/></p> <p><input type="checkbox"/> conserver ce destinataire pour mes prochains envois</p>	<p>Pays * <input type="text" value="FRANCE"/></p> <p>Code Postal * <input type="text" value="34170"/></p> <p>Ville * <input type="text" value="CASTELNAU LE LEZ"/></p> <p>Adresse * <input type="text" value="80 rue PITHAGORE"/></p> <p>Suite de l'adresse <input type="text" value="SUITE DE LA RUE DIDIER DAURAT"/></p> <p>Digicode / Interphone / étage <input type="text"/></p> <p>Référence Destinataire <input type="text" value="BIOMOL"/></p> <p><input type="checkbox"/> Enregistrer dans le carnet d'adresses destinataire ci-dessous :</p>
---	--

Dans la case Recherche un destinataire, indiquer BIOMOL.

L'adresse s'insèrera toute seule, vérifiez qu'il s'agit bien de l'adresse indiquée ci-dessus puis valider.

Indiquer les spécifications du colis.

PRODUITS ET OPTIONS

Sélectionner « Chrono marchandises Dangereuses 13 ».

4 Produits et options

Les produits

Informations produits	Information livraison *
<input checked="" type="radio"/> Chrono Marchandises Dangereuses 13	Date de livraison prévue 05/04/2019 avant 13:00

* meilleur délai exprimé en jours ouvrés donné à titre indicatif

Valider mes choix

Puis valider.

RECAPITULATIF DE VOS ENVOIS

Vérifier, modifier s'il y a besoin.

Réserver un enlèvement sur demande en ligne.

Modalités de remise des envois à CHRONOPOST

Pour toute demande d'enlèvement effectuée **avant 12h00**, celle-ci se fera dans l'après-midi et la livraison le lendemain avant 13h.

Pour toute demande d'enlèvement effectuée **après 12h00**, celle-ci se fera le lendemain après-midi et livraison le surlendemain avant 13h.

COMPTE

MEDIPATH

LIEU D'ENLEVEMENT

2 Lieu d'enlèvement

Rechercher dans le carnet d'adresses

Lieu * Mon adresse Une autre adresse ?

Adresse d'enlèvement:

Raison sociale	<input type="text"/>	Pays	FRANCE
Nom *	<input type="text"/>	Code postal *	<input type="text"/>
Prénom	<input type="text"/>	Ville *	<input type="text"/>
Téléphone (mobile de préférence) *	<input type="text"/>	Adresse *	<input type="text"/>
E-mail *	<input type="text"/>	Suite de l'adresse	<input type="text"/>
Référence expéditeur	<input type="text"/>	Digicode / Interphone / Étage	<input type="text"/>
		Service/Direction	<input type="text"/>

Enregistrer dans mon carnet d'adresses expéditeur

Adresse d'enlèvement

Entrer votre adresse.

Donneur d'ordre : MEDIPATH

Enregistrer dans mon carnet d'adresses expéditeur

Donneur d'ordre :	Je souhaite :
Raison sociale *	MEDIPATH ✓
Nom *	favet ✓
Prénom	raphaëlle
Téléphone (mobile de préférence) *	0494197280
E-mail *	r.favet@medipath.fr

Conserver ces informations pour mes prochaines réservations

Laisser à l'expéditeur la gestion des étiquettes de transport

DETAIL DE L'ENLEVEMENT



Suivre les indications et valider la réservation.

4.4 | Analyses réalisées

[Sommaire](#)

4.4.1 | Biopathologie moléculaire

4.4.1.1 Séquençage nouvelle génération (NGS)

Pour les tumeurs solides :

La méthode d'analyse est la technique de séquençage nouvelle génération (GeneStudio S5; Thermofisher) couvrant 100% du panel INCa : 25 gènes, 118 amplicons et plus de 1800 mutations, comprenant le panel **Oncomine™ Solid Tumor DNA** et **Oncomine™ Solid Tumor PLUS DNA V2** :

le kit **Oncomine™ Solid Tumor DNA Panel** (92 amplicons) couvrant les gènes AKT1 (exon 3), ALK (exon 22, 23, 25), BRAF (exon 11,15), CTNNB1 (exon 3), DDR2 (exon 5, 8, 12, 13, 14, 15, 17), EGFR (exon 12,18,19,20,21), ERBB2 (exon 19,20,21), ERBB4 (exon 3, 4, 6, 7, 8, 9, 15, 23), FBXW7 (exon 5, 8, 9, 10, 11), FGFR1 (exon 5, 8), FGFR2 (exon 7, 9, 12), FGFR3 (exon 7, 9, 14, 16, 18), KRAS (exon 2, 3, 4), MAP2K1 (exon 2), MET (exon 2, 14, 16, 19), NOTCH1 (exon 26, 27), NRAS (exon 2, 3, 4), PIK3CA (exon 10, 14, 21), PTEN (exon 1, 3, 6, 7, 8), SMAD4 (exon 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12), STK11 (exon 1, 4, 5, 6, 8), TP53 (exon 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10) ;

le kit **Oncomine™ Solid Tumor PLUS DNA V2 Panel** (44 amplicons) couvrant les gènes ALK (exon 24), EGFR (exon 12), ERBB4 (exon 10, 11), FGFR2 (exon 14), HRAS (exon 2, 3, 4), KIT (exon 8, 9, 11, 13, 14, 17, 18), MET (exon 14, 15, 17, 18, 20), PDGFRA (exon 12, 14, 18), POLE (exon 37, 38, 40, 41), ROS1 (exon 9, 13, 14), STK11 (exon 4, 5, 6, 8) et TERT (promoteur). Sensibilité analytique 5%.

Et le kit **Oncomine™ Focus Assay Fusion** qui couvre les fusions sur 23 gènes ABL1, AKT3, ALK, AXL, BRAF, EGFR (délétions), ERBB2, ERG, ETV1, 4 et 5, FGFR1, 2 et 3, MET, NTRK1, 2 et 3, PDGFRA, PPARG, RAF1, RET, ROS1.

Et le kit **Oncomine™ tumor specific panels BRCA Expanded panel** (17gènes) couvrant les gènes ATM, ARID1A, BRAF (HotSpot), BRCA1 et 2, BRIP1, CDK12, CHEK1 et 2, FANCA, FANCL, NBN, PALB2, PIK3CA, RAD51C et D, TP53. Sensibilité analytique 5%.

Pour les Biopsies liquides :

Le kit Oncomine™ Lung cfTNA Assays (35 amplicons) couvrant les gènes EGFR, ALK, BRAF, ERBB2, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PIK3CA, ROS et TP53 sur 169 hotspots incluant EGFR T790M, C797S, L858R, Exon 19 del, KRAS G12X,G13X,Q61X, BRAF V600E, ALK Exon 21-25, L115R, C1156Y, F1174C, L1196M, PIK3CA E545K, H1074R, E542K, MET exon 14 skipping, Gene fusions: ALK, RET, ROS1, Copy number gene (CNV): MET.

4.4.1.2 PCR

L'analyse par PCR est réalisée sur Système Idylla™ Biocartis à l'aide de cartouches utilisant des amorces spécifiques de l'allèle permettant une détection qualitative des mutations.

La cartouche Idylla™ KRAS Mutation Test permet la détection de 21 mutations KRAS codons 12 et 13 (exon 2 : G12C; G12R; G12S; G12A; G12D; G12V; G13D), codons 59 et 61 (exon 3 : A59T/E/G; Q61K; Q61L/R; Q61H) et codons 117 et 146 (exon 4 : K117N; A146P/T/V). La cartouche Idylla™ NRAS/BRAF Mutation Test permet la détection de 18 mutations NRAS dans les codons 12 et 13 (exon 2 : G12D; G12C; G12S; G12A/V; G13D; G13R/V), 59 et 61 (exon 3 : A59T; Q61K; Q61R; Q61L), 117 et 146 (exon 4 : K117N; A146T/V) et 5 mutations BRAF dans le codon 600 (V600E/D; V600K/R). La sensibilité analytique est inférieure à 5%, sauf pour les mutations dans les codons 13, 59, 117 (<10 %) et dans le codon 146 (<15 %) du gène NRAS (mutations rares, c.-à-d. <3 % des patients atteints d'un cancer colorectal présentant une mutation NRAS ou BRAF).

La cartouche Idylla™ BRAF Mutation Test permet la détection des mutations V600E/E2/D et V600K/R/M sur le codon 600 du gène BRAF. La sensibilité analytique de la technique est de 1%. Lorsque la quantité d'ADN présente est limitée mais suffisante, la sensibilité analytique des mutations V600K/R/M est de 5%.

La cartouche MSI Mutation Test permet la détection qualitative des mutations dans 7 nouveaux locus MSI (ACVR2A, BTBD7, DIDO1, MRE11, RYR3, SEC31A et SULF2). De plus, les biomarqueurs Idylla™ MSI étant spécifiques à la tumeur et indépendants des ethnies, il n'y a pas de tissu normal requis pour l'analyse et la détermination du statut MSI.

La cartouche Idylla™ EGFR Mutation Test détecte les mutations sur l'exon 18 (G719A/C/S), l'exon 20 (T790M, S768I), l'exon 21 (L858R, L861Q), les délétions sur l'exon 19 et les insertions sur l'exon 20 du gène EGFR. La sensibilité analytique de la technique est de 5%. Sauf pour la G179A qui est de 10%.

4.4.1.1 Signature génomique du Cancer du Sein

Le test EndoPredict® de Myriad International est un test qualitatif qui mesure l'expression de 12 gènes différents et utilise la technologie de la réaction en chaîne par polymérase quantitative par transcription inverse (RT-qPCR). Il permet de déterminer le risque de récurrence à distance chez les patientes présentant un cancer du sein primaire à récepteurs d'œstrogènes positifs, HER2 négatif et traité exclusivement par hormonothérapie adjuvante.

La sélection et la validation des gènes sont décrites dans Filipits et al. (2011). C'est à partir de l'expression relative des gènes impliqués dans le cancer du sein que le score moléculaire de 12 gènes est calculé à l'aide du logiciel EndoPredictR Report Generator. Le score moléculaire de 12 gènes, associé aux données cliniques relatives à la taille de la tumeur et au nombre de ganglions lymphatiques positifs, permet de calculer le score EPclin plus significatif. La « valeur seuil » permet de classer l'échantillon en fonction du risque élevé ou faible de récurrence à distance.

4.4.2 | Hybridation in situ par FISH

Organe ou Tumeur	Gène(s)	Technique(s)
Sarcomes	MDM2	FISH (N519)
	Autres sondes (PDGFR, cMyc, EWSR1, DDIT3, SS18)	FISH (N408, 509, N512, N513)
Lymphome	c-Myc BCL6 BC2	FISH (A070), FISH (N408)

Les demandes de FISH sont réalisées par les pathologistes Médipath experts-référents des réseaux labellisés.

Sur la plateforme NetSIG de CYPATH <https://genomique.cypath.fr>

4.5 | Réexpédition

[Sommaire](#)

Le matériel (bloc et lame) sera restitué par les plateformes MEDIPATH aux cabinets expéditeurs dans un délai d'un mois après réalisation des analyses (sauf demande express).