



MEDIPATH

Médecins pathologistes
indépendants

Manuel de prélèvements spécifique examens de biopathologie moléculaire

R08-GÉNÉ-INFOGEN-001 V3 applicable à partir du 28/01/2025



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.....	6
4.3.1	Préparation de la documentation associée	6
4.3.2	Conditionnement du matériel : Tissu	6
4.3.3	Conditionnement et recueil : Biopsies liquides	6
4.3.4	Traçabilité	7
4.3.5	Envoi de votre demande	7
4.4	Analyses réalisées.....	8
4.4.1	Biopathologie moléculaire.....	8
4.4.2	Hybridation in situ par FISH	10
4.5	Réexpédition	11

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 Mutations et Réarrangements ■ NGS BRCA-HRR ■ Score GIS ■ NGS Biopsie liquide 	<ul style="list-style-type: none"> ■ PCR Temps réel ■ Analyse de fragment (MSI / Clonalité) ■ Hyperméthylation MLH1 ■ PCR Signature génomique Sein
Tél. 04 99 13 62 37 (secrétariat) Tél. 04 99 13 62 36 (technique)	Contacts secrétariat : Géraldine MALBRANQUE et Solenn BONY secretariat.biopathologie@medipath.fr Contacts Technico-administratifs : Sophie MANZ s.manz@medipath.fr – Anthony MANDON a.mandon@medipath.fr Contact Technique : 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.

Le contingent cellulaire tumoral (CT) s'exprime en %. Il correspond au nombre total de cellules tumorales viables (A) rapporté au nombre total de cellules, tous types confondus (A, B, C).

$$CT (\%) = A / (A+B+C)$$

La détermination de ce % n'a pas à être très précise. Les résultats peuvent être regroupés comme suit : cellularité infime (<1%), faible (1-30%), forte (> 30%).

Les prélèvements avec cellularité infime ou très faible (< 10%) ne sont pas exploitables par les techniques actuelles de biologie moléculaire.

En cas de cellularité intermédiaire (10-50%), la zone la plus tumorale doit être cerclée en vue d'une macrodissection et le contingent tumoral doit être précisé dans la zone cerclée.

C'est le % de la zone cerclée qui est utilisé pour interpréter les résultats moléculaires, et cette information doit être présentée de manière non ambiguë et faire l'objet d'une qualification histologique (ZZQX129) sur les documents fournis lors de l'envoi du matériel tumoral.

Pièce opératoire :

- Si +30*% sur la lame cerclage inutile
- Si <30* % cercler la zone la plus grande possible pour atteindre les 30% en vue d'une macrodissection
*50% si BRAF

Biopsie :

- Si +30*% sur la lame cerclage inutile
- Si <30* % cercler la zone en vue d'une macrodissection (en notant que cette zone sera potentiellement épuisée après technique)

Culot/Cytologie/Amas :

- Macrodissection impossible donc pas de cerclage et évaluer % sur la totalité de la lame.

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.

% 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/Score GIS	30%
Méthylation du promoteur MLH1	20%

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. (Tous documents nécessaires à la bonne prise en charge de l'analyse, ordonnance si prescriptions reçu hors Netsig par le laboratoire ACP).

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 (ROCHE)
- 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 | 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.

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.

La génération de bon CHRONOPOST est possible via NetSIG

Pour activer cette possibilité prendre contact par mail : a.mandon@medipath.fr

Commander vos fournitures

En faire la demande par mail à secretariat.biopathologie@medipath.fr

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 sur GeneStudio S5 plus:

Le panel **Oncomine™ Solid Tumor DNA** et **Oncomine™ Solid Tumor PLUS DNA V2** 28 gènes, 134 amplicons et plus de 1800 mutations, comprenant :

- 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™ 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%.

Sur Genexus :

Le **kit Oncomine™ Precision Assay (mutation/CNV)** panel 45 gènes : AKT1, 2 et 3, ALK, AR, ARAF, BRAF, CDK4, CDKN2A, CHEK2, CTNNB1, EGFR, ERBB2, 3 et 4, ESR1, FGFR1, 2, 3 et 4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1 et 2, KIT, KRAS, MAP2K1 et 2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, 2 et 3, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RAF-1,RET, ROS1, SMO, TP53 dont 14 gènes pour la recherche d'amplification (CNV gain) : ALK, AR, CD274, CDKN2A, EGFR, ERBB2 et 3, FGFR1, 2 et 3, KRAS, MET, PIK3CA, PTEN. Sensibilité analytique 5% (2% pour les HotSpot) pour les prélèvements FFPE/cytologies.

Le **kit Oncomine™ Precision Assay (fusion)** : 20 gènes AR, ALK, BRAF, ESR1, EGFR, FGFR1, 2 et 3, MET, NRG1, NTRK1, 2 et 3, NUTM1, RET, ROS1, RSPO2 et 3.

Score GIS HRD (si BRCA1/2 non muté - Technique sous traitée) : enrichissement en capture (NextSeq 550Dx, Illumina) se basant sur le panel NGS Great. Les librairies sont construites avec un panel personnalisé Agilent Sureselect sur l'automate Magnis NGS Prep System (Agilent)

puis séquencées sur l'automate NextSeq 550 Dx System (Illumina). Le score HRD est calculé via le pipeline d'analyse avec le logiciel SeqOne sur la version hg19 du génome humain. Seuil de positivité : 0,5.

Pour les Biopsies liquides :

Sur Genexus :

Le **kit Oncomine™ Precision Assay (mutation)** panel 45 gènes (AKT1, 2 et 3, ALK, AR, ARAF, BRAF, CDK4, CDKN2A, CHEK2, CTNNB1, **EGFR**, ERBB2, 3 et 4, **ESR1**, FGFR1, 2, 3 et 4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1 et 2, KIT, KRAS, MAP2K1 et 2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, 2 et 3, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RAF-1, RET, ROS1, SMO, TP53) et 14 gènes pour la recherche d'amplification (CNV gain) (ALK, AR, CD274, CDKN2A, EGFR, ERBB2 et 3, FGFR1, 2 et 3, KRAS, MET, PIK3CA, PTEN. Sensibilité analytique 0,5% pour les biopsies liquides.

Pour les cytologies thyroïdiennes :

Sur GeneStudio S5 plus

Un **panel custom THYROID** et le **kit AmpliSeq™** pour la recherche de fusion des 2 gènes : RET et PAX8 et les mutations sur 8 gènes : BRAF (ex11,15), KRAS (ex2,3,4), NRAS (ex2,3,4), PIK3CA (ex10,14,21), PTEN (all exons), TP53 (all exons), HRAS (ex2,3,4), et le promoteur de TERT.

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 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%.

Recherche de **méthylation du gène MLH1** (Technique sous traitée) : PCR quantitative spécifique à la méthylation du promoteur MLH1 (MethylDetect) sur Cobas Z480 (Roche) (Sensibilité : 1% de méthylation du promoteur MLH1 cellules mutées).

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 traite 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 EndoPredict® 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.

4.4.1.1 Analyse de fragment

La recherche d'instabilité Micro satellitaire est effectuée par Analyse de fragment sur le SeqStudio

13 Marqueurs sont étudiés dans le TrueMark™ MSI Assay (BAT-25, BAT-26, BAT-40, CAT-25, NR-21, NR-22, NR-24, NR-27, ABI-16, ABI-17, ABI-19, ABI-20A, ABI-20B) ainsi que 2 contrôle d'échantillon (PentaD, TH-01).

4.4.2 | Hybridation in situ par FISH

Organe ou Tumeur	Gène(s)	Technique(s)
Sarcomes	MDM2	FISH (N519)
	Autres sondes (PDGFB, 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).