

EXIGENCES PREANALYTIQUES


I. EXIGENCES ADMINISTRATIVES

I.1 Heures d'ouverture du Laboratoire Génétique des Tumeurs Solides

Le laboratoire est ouvert tous les jours sauf les samedis, dimanches et jours fériés de 9h00 à 17h00. Les prélèvements doivent parvenir dans cette période d'ouverture.


En dehors des jours et des heures d'ouverture du laboratoire, les prélèvements doivent être conservés selon les exigences pré analytiques définies ci-après.

I.2 Identification complète



Identification complète du prélèvement et concordance parfaite avec l'identité de la feuille de demande et le compte-rendu anatomopathologique si celui-ci est disponible.

I.3 Demande d'examen renseignée (bon(s) de demandes d'examens / feuille de prescription)

- 
- Identification du pathologiste et du clinicien prescripteurs
 - Type de prélèvement (pièce opératoire, biopsie, cytologie ...)
 - Type de tumeur (primitive, métastase, récidive...)
 - Site anatomique,
 - Numéro de référence anatomopathologique
 - **Pourcentage de cellules tumorales** (supérieur à 20% dans la mesure du possible et supérieur à 30% pour la recherche de mutation des gènes BRCA1 et 2) et renseignements sur particularités (nécrose, inflammation...)
- Remarque : Le pourcentage de cellules tumorales correspond à l'estimation de la proportion de cellules tumorales sur l'ensemble des cellules (hors nécrose) présentes sur la coupe ou sur la zone du prélèvement qui a été sélectionnée (BONNES PRATIQUES POUR LA RECHERCHE À VISEE THERANOSTIQUE DE MUTATIONS SOMATIQUES DANS LES TUMEURS SOLIDES. <http://www.e-cancer.fr/>)*

I.4 Compte rendu anatomopathologique

Joindre le compte rendu anatomopathologique si disponible


I.5 Conditionnement

Les prélèvements doivent être conditionnés par patient : un sachet, une demande, un prélèvement.

II. EXIGENCES LIEES AU PRELEVEMENT

II.1 Prélèvements fixés en formol et inclus en paraffine

II.1.1 Fixation des prélèvements :

- 
- **Fixateur** : le formol tamponné (4 à 10%) est recommandé. **Le liquide de Bouin, picrique ou Bouin de Hollande, l'éosine, ainsi que les décalcifiants sont proscrits. Les fixateurs hydro-alcooliques sont déconseillés.**
 - Les prélèvements osseux ne doivent pas subir d'étape de décalcification

II.1.2 Transport des prélèvements :

Le transport s'effectue à température ambiante*.

II.1.3 Recherche de mutations géniques

1. *Pièce opératoire ou biopsie chirurgicale*
 - 4 coupes tissulaires (copeaux) de la zone tumorale de 20µm d'épaisseur dans un microtube de type **ependorf de 1.5 à 2 ml stérile (tubes recommandés : safe-lock ependorf tubes®)**. Pour toute demande de technique **RNAseq**, il est **fortement recommandé de nous adresser 2 tubes** (de 4 coupes tissulaires chacune).
2. *Petite biopsie, ou prélèvement hétérogène nécessitant une macrodissection*
 - Bloc paraffine accompagné d'une lame HES ou HE en miroir avec cerclage de la zone tumorale, permettant de se repérer sur le bloc paraffine.

II.1.4 détection d'instabilité des séquences microsatellites

EXIGENCES PREANALYTIQUES

Si cette demande est concomitante d'une demande de recherche de mutation, il n'est pas nécessaire de nous adresser le matériel en double.

1. Dans le cancer colo rectal

- 4 coupes tissulaires (copeaux) de la zone tumorale de 20µm d'épaisseur dans un microtube de type **ependorf de 1.5 à 2 ml stérile (tubes recommandés : safe-lock ependorf tubes®)**.
- ou bloc paraffine accompagné d'une lame HES ou HE en miroir avec cerclage de la zone tumorale, permettant de se repérer sur le bloc paraffine.

2. Dans les cancers autres que le cancer colorectal

Les anomalies étant discrètes dans certains tissus (ovaire, endomètre...), il est fortement recommandé de réaliser en parallèle l'analyse sur du tissu non tumoral et du tissu tumoral.

- 4 coupes tissulaires (copeaux) de 20µm d'épaisseur dans un microtube de type **ependorf de 1.5 à 2 ml stérile (tubes recommandés : safe-lock ependorf tubes®)**.
- ou bloc paraffine accompagné d'une lame HES ou HE en miroir avec cerclage de la zone tumorale, permettant de se repérer sur le bloc paraffine.

II.1.5 Bloc d'inclusion en paraffine pour analyse par CGH-array (Hybridation génomique Comparative)

- **Minimum 10 copeaux de 50 µm d'épaisseur** représentatifs de la zone tumorale pour les pièces opératoires uniquement.
- Ou bloc paraffine accompagné d'une lame HES en miroir avec cerclage de la zone tumorale, le cas échéant.

II.1.6 Lames blanches pour analyse FISH à la recherche de fissions/fusion (translocations, inversions), délétion ou amplification géniques

- 3 à 5 lames blanches polysinées ou silanées avec coupes tumorales de 5µm d'épaisseur, accompagnées de la lame HES ou HE miroir avec repère de la zone tumorale. Lors de la préparation des lames, deux types de liquides peuvent être utilisés (eau stérile ou eau albuminée).

II.2 Prélèvements frais (non congelé, non fixé) (uniquement mélanomes choroïdiens ou cas particuliers)

- Prélèvement primaire effectué en condition aseptique.
- Milieu de transport : les tubes contenant le milieu de transport stérile (de type RPMI) sont fournis sur demande par le Laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides. Ils doivent être conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation. Une fois le prélèvement tumoral déposé dans le tube de transport de manière aseptique, celui-ci doit être conservé à température ambiante*. Les tubes de transport contiennent un indicateur coloré rose, témoin du pH adéquat. En cas de virage au jaune du milieu, le tube doit être jeté.
- En cas de prélèvement en dehors des heures d'ouverture du laboratoire, les prélèvements frais doivent être conservés à température ambiante* et doivent nous parvenir dans les délais prévus (maximum 3 jours).
- Dans le cas exceptionnel où un prélèvement frais est effectué une veille de grand week-end excédant 3 jours (avec un lundi férié par exemple), le laboratoire doit être prévenu soit par **téléphone (04 93 37 70 12)** le vendredi avant 17h, soit par **fax en précisant où est conservé le prélèvement (04 92 03 75 29)**. Un technicien de garde est toujours présent à partir du troisième jour de fermeture.

II.3 Prélèvements congelés pour biologie moléculaire ou CGH array

- *Etant donné les contraintes de transport des prélèvements congelés, les analyses doivent être réalisées en priorité sur les blocs d'inclusion en paraffine. L'analyse sur prélèvement congelé est réservée aux cas où l'analyse n'a pas été réalisable à partir d'un bloc d'inclusion (taille insuffisante, fixation inadéquate...) ou pour des cas particuliers (vérification de résultats, protocoles spécifiques)*
- Taille minimum de 0,5 cm³
- Prélèvements conservés à -80°C ou en azote liquide (cryotubes) correctement identifiés. Transport dans carboglace avec acheminement < 24 heures par un transporteur. En dehors des jours et des heures d'ouverture du laboratoire, les prélèvements doivent être conservés dans les laboratoires correspondants à -80°C ou azote liquide et nous parvenir dans les délais recommandés.

II.4 ADN

- Microtube de type **ependorf de 1.5 à 2 ml stérile (tubes recommandés : safe-lock ependorf tubes®)** ou barrette de 8 puits avec fermeture parafilm. Transport à température ambiante*.
- La méthode d'extraction et la concentration doivent être précisées.

EXIGENCES PREANALYTIQUES

II.5 ADN dans le sang circulant pour analyse par Droplet Digital PCR

- **Sang total : 10 ml** prélevé
 - soit sur **tubes spéciaux** permettant la stabilisation de l'échantillon (type Roche, Streck, Qiagen)
 - soit sur **tubes EDTA**.

Le prélèvement peut se faire avec ou sans vacutainer et doivent être retournés de manière douce 10 fois après le prélèvement pour bien homogénéiser le sang avec le milieu stabilisant.

- Délai et condition de Transport :
 - **Le prélèvement en tube EDTA doit nous parvenir dans un délai de 2 heures maximum à température ambiante***.
 - **Le prélèvement en tubes spéciaux doit nous parvenir dans un délai de 72 heures (acceptable jusqu'à 6 jours selon les fournisseurs en se référant à la notice) à température ambiante***.

III. EXIGENCES LIEES AU TRANSPORT

Voir tableau récapitulatif ci-dessous. (IV).

EXIGENCES PREANALYTIQUES

IV. TABLEAU DE SYNTHÈSE :

Matériel biologique nécessaire pour la réalisation des analyses par le Laboratoire de Génétique des Tumeurs Solides.

En complément, voir LISTE DES ANALYSES RÉALISÉES AU LABORATOIRE GÉNÉTIQUE DES TUMEURS SOLIDES (LABO-GTS-GU-001) et la LISTE DES CRITÈRES DE REFUS (LABO-GTS-LI-010)

Analyse	Indications principales	Techniques utilisées	Conditions de transport et de conservation	Matériel biologique à communiquer
CGH-array (Hybridation Génomique Comparative)	Anomalies chromosomiques quantitatives	Hybridation de l'ADN tumoral sur puces ADN oligonucléotidiques	Prélèvement conservé à -80°C ou en azote liquide transport < à 24h dans carboglace	Fragment congelé
			Transport à température ambiante* Pas de délai d'acheminement	Bloc paraffine** ou 10 copeaux de 50 µm (type de prélèvement à privilegier en 1 ^{ère} intention)
			Milieu de transport conservé à 4°C (avant utilisation) et transport après prélèvement : maximum 3 jours à température ambiante*	Prélèvement frais (non congelé, non fixé), en milieu de transport tumeur (fourni à la demande par le laboratoire) Cas particuliers notamment mélanomes choroïdiens.
BIOLOGIE MOLECULAIRE Mutations Fusions	Cancer colorectal et Cancer pulmonaire (adénocarcinome non à petites cellules)	NGS (panel 22 gènes lon Ampliseq Colon - Lung Cancer Panel V2 (Life Technologies))	Transport et conservation à température ambiante* Pas de délai d'acheminement	4 coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine (copeaux) de la zone tumorale (20µm) en microtube de 1.5 à 2 ml stérile de type eppendorf (safe lock® de préférence) Ou A défaut Bloc paraffine** <i>(en cas de petites biopsies ou si le prélèvement est hétérogène)</i> <i>(Ce bloc ne sera plus utilisable pour des analyses ultérieures en FISH)</i>
	Mélanome	NGS (panel 50 gènes lon Ampliseq Cancer Hotspot Panel V2 (Life Technologies))		
	GIST (Tumeur stromale gastro intestinale)	NGS (panel 50 gènes lon Ampliseq Cancer Hotspot Panel V2 (Life Technologies))		
	Mélanome de type Dubreuilh ou acro-lentigineux ou muqueux	NGS (panel 50 gènes lon Ampliseq Cancer Hotspot Panel V2 (Life Technologies))		
	Cancer du rein	Séquençage direct (c-MET)		

EXIGENCES PREANALYTIQUES

Analyse	Indications principales	Techniques utilisées	Conditions de transport et de conservation	Matériel biologique à communiquer
	Tumeur desmoïde Médulloblastome	Pyroséquençage CTNNB1 (β -caténine) NGS (panel 50 gènes Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel V2 (Life Technologies))		
	Cancers ovaires	NGS BRCA MASTR+ (Multiplicom)		
BIOLOGIE MOLECULAIRE Détection d'instabilités des séquences microsatellites (MSI)	Cancer colorectal Cancer de l'endomètre, carcinome sébacé...	PCR et séquençage capillaire		4 coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine (copeaux) de la zone tumorale (20 μ m) en microtube de 1.5 à 2 ml stérile de type eppendorf (safe lock® de préférence) Ou A défaut Bloc paraffine** (en cas de petites biopsies ou si le prélèvement est hétérogène) Tissu tumoral Et <u>Tissu non tumoral pour toutes les tumeurs hors colon</u>
	Cancer pulmonaire	FISH (ALK,ROS1) (MET)		3 à 5 lames blanches silanées ou polysinées** coupes formol paraffine (5 μ m)
FISH Remaniement génique de type fission/fusion Altération quantitative (amplification, gain)	Sarcomes et tumeurs des tissus mous Détection d'anomalies chromosomiques structurales (Fissions/fusions géniques) et/ou quantitatives (amplification, délétion) (voir LABO-GTS-GU-001) Dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand.	FISH interphasique	Transport à température ambiante* Pas de délai d'acheminement	3 à 5 lames blanches silanées ou polysinées** coupes formol paraffine (5 μ m)
	Liposarcome non différencié ou dédifférencié Amplification MDM2	FISH interphasique (et/ou CGH-array)	Transport à température ambiante* Pas de délai d'acheminement	5 lames blanches silanées ou polysinées** coupes formol paraffine (5 μ m) (Bloc paraffine** pour CGH-array)

EXIGENCES PREANALYTIQUES

Analyse	Indications principales	Techniques utilisées	Conditions de transport et de conservation	Matériel biologique à communiquer
BIOLOGIE MOLECULAIRE Fusion	Cancer du poumon Sarcomes	RNAseq	Transport à température ambiante* Pas de délai d'acheminement	4 coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine (copeaux) de la zone tumorale (20µm) en microtube de 1.5 à 2 ml stérile de type eppendorf (safe lock® de préférence) Ou A défaut Bloc paraffine** <i>(en cas de petites biopsies ou si le prélèvement est hétérogène)</i>
BIOLOGIE MOLECULAIRE RT-PCR	Rhabdo-myosarcome Synovialo- sarcome	RT-PCR (pour alternative ou complément de l'analyse FISH)	Transport à température ambiante* Pas de délai d'acheminement	4 coupes tissulaires formol paraffine (copeaux) de la zone tumorale (20µm) en microtube de 1.5 à 2 ml stérile de type eppendorf (safe lock® de préférence) ou bloc paraffine**
			Conservé à -80°C ou en azote liquide transport < à 24h dans carboglace	Fragment congelé
BIOLOGIE MOLECULAIRE ADN TUMORAL CIRCULANT (sang total)	Cancer pulmonaire (adénocarcinome non à petites cellules)	DROPLET DIGITAL PCR	Transport à température ambiante* Tube EDTA (délai de transport inférieur à 2 heures) Tube type Streck® , Roche ou Qiagen (délai de transport 72 heures, acceptable 6 jours maximum).	Prélèvement de sang veineux sur Tube EDTA Tube type Streck® , Roche® ou Qiagen® ***

*Le transport est effectué à température ambiante qui est non critique (néanmoins, la température ne doit pas excéder 50°C, température proche du point de fusion de la paraffine utilisée en anatomopathologie).

Pour l'ADN tumoral circulant, la température de transport doit être comprise entre 18 et 25°C.

**Dans les cas de lames blanches et de bloc paraffine, il est impératif de transmettre la lame HE ou HES avec repérage de la zone tumorale.

***Pour les tubes de sang type tube **Cell Free DNA** nous contacter au besoin.