

 CHU UCL NAMUR Dinant • Godinne • Sainte-Elisabeth	LAP-POL-0064
	Version 002
ASBL - Av. Docteur G. Thérasse, 1- B5530 Yvoir (Belgique)	
Politique – Site(s) : <i>Godinne</i> – Service(s) :	Date d'application : 04 mars 2025
Biomarqueurs et tests moléculaires (Analyses sous-traitées)	Page 1 sur 17

<u>Auteur(s)</u>	<u>Vérificateur(s)</u>	<u>Approbateur(s)</u>
Emilie DEVILLEZ	Marie-Cécile NOLLEVAUX	Marie-Cécile NOLLEVAUX

Table des matières :

1. Objet	2
2. Domaine d'application	2
3. Définitions et abréviations.....	2
4. Responsabilités	2
5. Description de la politique.....	2
5.1 Analyses immunohistochimiques	2
5.1.1 Facteurs pronostiques et prédictifs du cancer du sein.....	2
5.1.2 Recherche immunohistochimique de la surexpression du récepteur HER2 dans le cancer de l'estomac et du bas-œsophage	3
5.1.3 Recherche immunohistochimique de ALK dans les néoplasies pulmonaires	4
5.1.4 Recherche immunohistochimique de ROS1 dans les néoplasies pulmonaires	4
5.1.5 Recherche immuno-histochimique du PD-L1 dans les néoplasies	5
5.1.6 Recherche immunohistochimique de la présence du récepteur c-Kit (CD117)	6
5.2 Analyses combinées immunohistochimie et biologie moléculaire	7
5.3 Analyses en biologie moléculaire	8
5.3.1 Le typage HPV	9
5.3.2 La recherche par PCR des MYCOBACTERIES et tuberculosis et des BARTONELLA	10
5.3.3 La recherche par PCR d'ADN d'ECHINOCOCCUS.....	10
5.3.4 L'analyse NGS (Next Generation Sequencing)	11
5.3.5 L'analyse par Polymerase Chain Reaction-PCR.....	14
5.3.6 L'analyse par HYBRIDATION IN SITU –FISH, SISH.....	15
6. Référence des documents utilisés	17

1. Objet

Ce document contient toutes les informations relatives aux traitements des échantillons ainsi que des informations précises concernant l'analyse des biomarqueurs et des tests moléculaires.

2. Domaine d'application

Cette politique est applicable aux membres du personnel de . Ce document est en vigueur au CHU UCL Namur, site(s) Godinne.

3. Définitions et abréviations

SAP : Service (laboratoire) d'Anatomie Pathologique.

Prélèvement : Matériel humain confié au SAP pour réaliser une analyse anatomo-pathologique (macroscopie, cytologie, histologie, immunohistochimie, immunofluorescence, biologie moléculaire).

4. Responsabilités

N/A

5. Description de la politique

5.1 Analyses immunohistochimiques

La plupart des analyses immunohistochimiques sont du ressort exclusif du pathologiste qui les prescrit en fonction des nécessités diagnostiques.

Certaines analyses néanmoins doivent absolument être demandées par le médecin prescripteur de l'analyse: exemples : la recherche d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone dans le cadre du cancer du sein, la recherche de sur-expression du récepteur HER2, dans le cadre du cancer du sein et du cancer du bas œsophage, de l'estomac ou colorectal, la recherche d'expression du récepteur EGFR, dans le cadre du cancer pulmonaire non à petites cellules, la recherche d'expression de ALK dans le cancer pulmonaire non à petites cellules non squameux, la recherche d'expression de ROS-1 dans le cancer pulmonaire non à petites cellules non squameux, la recherche du récepteur c-Kit, dans le cadre des tumeurs stromales du tractus gastro-intestinal (GIST).

5.1.1 Facteurs pronostiques et prédictifs du cancer du sein

L'expression des récepteurs hormonaux (récepteurs des œstrogènes et récepteur de la progestérone) sont des facteurs prédictifs quant à la réponse au traitement anti-hormonal (par ex, le tamoxifène). Ils sont recherchés systématiquement pour tout nouveau diagnostic de cancer mammaire ou après traitement adjuvant, afin de vérifier une éventuelle modification de leur statut par le traitement.

La sur-expression du récepteur HER2 est non seulement un facteur pronostique mais il comporte également un caractère prédictif puisqu'il est directement corrélé à la réponse au traitement par thérapie ciblée anti-HER2 (Trastuzumab). Une sur-expression détectée en immunohistochimie doit être validée par la recherche d'une amplification du gène par ISH.

Outre les éléments mentionnés au point 4.2, **le prescripteur mentionne explicitement sur la demande d'analyse qu'il souhaite, si l'échantillon aboutit au diagnostic de néoplasie mammaire, que soient recherchés les facteurs pronostiques/prédictifs :**

- Récepteurs hormonaux ER et PR
- Sur-expression du récepteur HER

En pratique :

- L'analyse immunohistochimique est réalisée à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ayant été préalablement fixés au formol 4% pH neutre. La durée de fixation recommandée est comprise entre 6 et 48 heures et le délai avant fixation doit être le plus court possible ; en aucun cas, il ne peut excéder 1h. La date et l'heure de fixation doivent être indiquées sur la feuille de demande.
- *Pour les prélèvements ayant nécessité une décalcification, l'analyse est réalisée mais nous ne pouvons garantir la validité du résultat.*
- Pour des blocs envoyés de l'extérieur, aucun conditionnement particulier n'est nécessaire ; le compte-rendu anatomo-pathologique doit être associé. Le médecin prescripteur vérifie la fixation adéquate du prélèvement.
- Le résultat est intégré au protocole anatomo-pathologique ou fera l'objet d'un protocole additionnel. Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.

Pathologistes référents :

Professeur M-C. Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

5.1.2 Recherche immunohistochimique de la surexpression du récepteur HER2 dans le cancer de l'estomac et du bas-œsophage

La sur-expression du récepteur HER2 est non seulement un facteur pronostique mais il comporte également un caractère prédictif puisqu'il est directement corrélé à la réponse au traitement par thérapie ciblée anti-HER2 (Trastuzumab). Une sur-expression détectée en immunohistochimie doit être validée par la recherche d'une amplification du gène par ISH.

Outre les éléments mentionnés au point 4.2, **le prescripteur mentionne explicitement sur la demande d'analyse qu'il souhaite, que soit recherché le statut HER2.**

En pratique :

- L'analyse immunohistochimique est réalisée à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ayant été préalablement fixés au formol 4% pH neutre. La durée de fixation recommandée est comprise entre 6 et 48 heures et le délai avant fixation doit être le plus court possible ; en aucun cas, il ne peut excéder 1h. La date et l'heure de fixation doivent être indiquées sur la feuille de demande.
- *Pour les prélèvements ayant nécessité une décalcification, l'analyse est réalisée mais nous ne pouvons garantir la validité du résultat.*
- Pour des blocs envoyés de l'extérieur, aucun conditionnement particulier n'est nécessaire ; le compte-rendu anatomo-pathologique doit être associé. Le médecin prescripteur vérifie la fixation adéquate du prélèvement.
- Le résultat est intégré au protocole anatomo-pathologique ou fera l'objet d'un protocole additionnel. Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.

Pathologistes référents :

Professeur M-C. Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

5.1.3 Recherche immunohistochimique de ALK dans les néoplasies pulmonaires

Des réarrangements du gène ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) ont été décrits chez 3 à 5% des patients porteurs d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules (surtout adénocarcinomes).
Ils sont mutuellement exclusifs avec les mutations EGFR et KRAS et sont mis en évidence par FISH.
L'analyse FISH conditionne le remboursement d'une thérapie ciblée inhibant la Kinase ALK (ex. crizotinib).
L'immunohistochimie ALK est considérée comme une méthode de screening pour sélectionner les patients au testing FISH.

Cette demande d'analyse immunohistochimique (ainsi que la demande de recherche de réarrangement – cf. infra Point 4.8, analyses en biologie moléculaire) doit être **explicitement mentionnée par le prescripteur** sur le formulaire de demande d'analyse, soit de manière libre, soit en cochant la case adéquate dans la liste des tests pharmacodiagnostiques et de biologie moléculaire proposés.

En pratique :

- L'analyse immunohistochimique est réalisée à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ayant été préalablement fixés au formol 4% pH neutre ou, en ce qui concerne les cell-blocks, fixation formol 4%, pH neutre.
- La durée de fixation recommandée est comprise entre 6 et 48 heures. La date et l'heure de fixation doivent être indiquées sur la feuille de demande. Le délai avant fixation doit être le plus court possible ; en aucun cas, il ne peut excéder 1h.
- Pour les prélèvements ayant nécessité une décalcification, l'analyse est réalisée mais nous ne pouvons garantir la validité du résultat.
- Pour des blocs envoyés de l'extérieur, aucun conditionnement particulier n'est nécessaire ; le compte-rendu anatomo-pathologique doit être associé. Le médecin prescripteur vérifie la fixation adéquate du prélèvement.
- Le résultat est intégré au protocole anatomo-pathologique ou fera l'objet d'un protocole additionnel. Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.

Pathologistes référents :

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

5.1.4 Recherche immunohistochimique de ROS1 dans les néoplasies pulmonaires

Des réarrangements du gène ROS1 ont été décrits chez 1 à 3% des patients porteurs d'un cancer pulmonaire non à petites cellules (surtout adénocarcinomes).
Ils sont mutuellement exclusifs avec les mutations d'EGFR et les réarrangements de ALK.
Un réarrangement de ROS1 serait associé à une réponse thérapeutique au crizotinib.
L'immunohistochimie est à ce jour considérée comme un outil diagnostique potentiel permettant d'évaluer la présence de la protéine de fusion ROS1.
Cette demande d'analyse immunohistochimique (ainsi que la demande de recherche de réarrangement – cf. infra Point 4.8, analyses en biologie moléculaire) doit être **explicitement mentionnée par le prescripteur** sur le formulaire de demande d'analyse, soit de manière libre, soit en cochant la case adéquate dans la liste des tests pharmacodiagnostiques et de biologie moléculaire proposés.

Cette analyse est confiée en sous-traitance au laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques Universitaires St Luc à Woluwé.

Ci-dessous, les prescriptions de ce laboratoire concernant l'analyse sus-mentionnée, issues du formulaire de demandes d'analyse (formulaire de demande d'analyses extérieures, Form 4201 version 1.0 28/04/2023)

IMMUNOHISTOCHIMIE : □ ROS1 (poumon)

(analyse accréditée BELAC, certificat n°369-MED)

Doivent être mentionnés : le Centre demandeur (Pathologiste + Prescripteur), les coordonnées du Patient, des informations techniques concernant l'échantillon (date de prélèvement, référence centre demandeur, délai et durée de fixation).

Aspects pratiques :

Les tests sont réalisés à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ayant été préalablement fixés au formol 4% pH neutre.

La durée de fixation recommandée varie entre 6 et 48 heures.

Pour l'envoi, il ne faut pas de conditionnement particulier.

Le protocole anatomo-clinique complet doit être associé.

Le médecin prescripteur vérifie la fixation adéquate du prélèvement.

Les tests sont réalisés au minimum 1 fois par semaine et le délai de réponse est de 8 jours.

Le résultat sera intégré au protocole anatomo-pathologique ou fera l'objet d'un compte-rendu additionnel.

Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.

Personnes de contact :

Pr C Galant, Chef de Service, 02/764 67 37 (secrétariat)

Dr Sc Y Guiot, Responsable opérationnel, 02/764 67 37 (secrétariat)

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

5.1.5 Recherche immuno-histochimique du PD-L1 dans les néoplasies

PD-L1 est une protéine transmembranaire exprimée à la surface de certains macrophages ; elle est induite par des cytokines inflammatoires dans divers tissus. Elle se lie au récepteur PD-1, exprimé à la surface de cellules immunitaires (lymphocytes T...).

En situation normale, les cellules utilisent l'interaction PD-1/PD-L1 comme mécanisme de protection contre des réactions auto-immunes en inhibant l'action des lymphocytes T.

Différents types de cancers surexpriment PD-L1 (mélanome, carcinome rénal, carcinome pulmonaire non à petites cellules...) ; ils échappent ainsi à la réponse immunitaire, inhibant l'activation des lymphocytes.

Dans ce cadre, l'immunothérapie devient une arme contre le cancer. Des anticorps monoclonaux (par ex. pembrolizumab, nivolumab...) bloquent l'interaction PD-1/PD-L1, et permettent aux lymphocytes T d'être actifs, entraînant une réponse immunitaire contre les cellules tumorales.

Cette recherche est d'application sur différents types de cancers (pulmonaire, sphère ORL, urologie, digestifs, mammaires, ...)

En fonction de la localisation, l'expression de PD-L1 est établie sous la forme d'un TPS (en %) ou d'un CPS (chiffre absolu).

Cette demande d'analyse immunohistochimique doit être explicitement mentionnée par le prescripteur sur le formulaire de demande d'analyse, soit de manière libre ou en cochant la case adéquate.

En pratique :

- L'analyse immunohistochimique est réalisée à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ayant été préalablement fixés au formol 4% pH neutre ou, en ce qui concerne les cell-blocks, fixation formol 4% pH neutre.
- La durée de fixation recommandée est comprise entre 6 et 48 heures. La date et l'heure de fixation doivent être indiquées sur la feuille de demande. Le délai avant fixation doit être le plus court possible ; en aucun cas, il ne peut excéder 1h.
- Pour les prélèvements ayant nécessité une décalcification, l'analyse est réalisée mais nous ne pouvons garantir la validité du résultat.
- Pour des blocs envoyés de l'extérieur, aucun conditionnement particulier n'est nécessaire ; le compte-rendu anatomo-pathologique doit être associé. Le médecin prescripteur vérifie la fixation adéquate du prélèvement.
- Le résultat est intégré au protocole anatomo-pathologique ou fera l'objet d'un protocole additionnel. Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Professeur MC Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

5.1.6 Recherche immunohistochimique de la présence du récepteur c-Kit (CD117)

La recherche de l'expression du récepteur tyrosinas-kinase c-Kit, en immunohistochimie, est un élément diagnostique positif des tumeurs stromales du tractus gastro-intestinal (GIST), tumeurs mésenchymateuses caractérisées par des mutations activatrices du proto-oncogène c-Kit.

Son expression dans le cadre d'un GIST comporte également un caractère prédictif puisque corrélé à une probabilité de réponse au traitement par thérapie ciblée anti-c-Kit (Imatinib - Glivec®).

Il est à noter que certains GIST présentent d'autres types de mutations activatrices, notamment en rapport avec le gène codant pour le récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFRA).

En cas de suspicion clinique de tumeur stromale de type GIST, il est demandé au prescripteur de **mentionner explicitement** sur la demande qu'il souhaite une recherche de l'expression du récepteur c-Kit.

En pratique :

- L'analyse immunohistochimique est réalisée à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ayant été préalablement fixés au formol 4% pH neutre ou, en ce qui concerne les cell-blocks, fixation formol 4% pH neutre.
- La durée de fixation recommandée est comprise entre 6 et 48 heures. La date et l'heure de fixation doivent être indiquées sur la feuille de demande. Le délai avant fixation doit être le plus court possible ; en aucun cas, il ne peut excéder 1h.
- Pour les prélèvements ayant nécessité une décalcification, l'analyse est réalisée mais nous ne pouvons garantir la validité du résultat.
- Pour des blocs envoyés de l'extérieur, aucun conditionnement particulier n'est nécessaire ; le compte-rendu anatomo-pathologique doit être associé. Le médecin prescripteur vérifie la fixation adéquate du prélèvement.
- Le résultat est intégré au protocole anatomo-pathologique ou fera l'objet d'un protocole additionnel. Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Professeur MC Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A Laka, 081/42 30 34

5.2 Analyses combinées immunohistochimie et biologie moléculaire

➤ La recherche du phénotype MSI : cancer colo-rectal (et autres cancers)

La genèse de certains cancers colo-rectaux est liée à une instabilité génétique induite par la défaillance du système de réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR ou mismatch repair) ; les cancers présentant un tel phénotype sont dits MSI (microsatellite instability).

15 à 20 % des cancers colorectaux sporadiques et la quasi-totalité des cancers colorectaux survenant dans le contexte du syndrome de Lynch sont concernés.

La connaissance d'un phénotype MSI est prédictive : à stade égal, le pronostic est meilleur que dans le phénotype MSS (microsatellite stability). Elle est aussi thérapeutique, orientant le choix des traitements adjuvants. Les guidelines ESMO recommandent de tester tous les cancers colo-rectaux.

La détermination du statut MSI repose sur l'analyse de l'ADN tumoral et sur des colorations immunohistochimiques.

Cette recherche qui, initialement concerne essentiellement le cancer colo-rectal, tend à s'étendre à d'autres types de cancers (ex. pancréas...)

Ces recherches doivent être **explicitement mentionnées par le prescripteur** sur le formulaire de demande d'analyse, soit de manière libre, soit en cochant la case adéquate dans la liste des tests de biologie moléculaire proposés.

Ces analyses sont confiées en sous-traitance au laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques Universitaires St Luc à Woluwé.

Ci-dessous, les prescriptions de ce laboratoire, concernant l'analyse susmentionnée issues du formulaire de demandes d'analyse (formulaire de demande d'analyses extérieures, Form 4201 version 1.0 28/04/2023)

IMMUNOHISTOCHIMIE : □ MMR (MisMatch Repair) : MLH1, MSH2, MSH6, PMS2
(analyse accréditée BELAC, certificat n°369-MED)

PCR – POLYMERASE CHAIN REACTION : □ MSI (instabilité des microsatellites)

Doivent être mentionnés : le Centre demandeur (Pathologiste + Prescripteur), les coordonnées du Patient, des informations techniques concernant l'échantillon (date de prélèvement, référence centre demandeur, délai et durée de fixation).

Aspects pratiques :

Les tests sont réalisés à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ayant été préalablement fixés au formaldéhyde 4% pH neutre.

La durée de fixation recommandée varie entre 6 et 48 heures.

Pour l'envoi, il ne faut pas de conditionnement particulier.

Le protocole anatomo-clinique complet doit être associé.

Le médecin prescripteur vérifie la fixation adéquate du prélèvement.

Le délai de réponse est de 8 jours pour l'immunohistochimie et de 15 jours pour la PCR.

Le résultat sera intégré au protocole anatomo-pathologique ou fera l'objet d'un compte-rendu additionnel. Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.

Personnes de contact :

Pr C Galant, Chef de Service, 02/764 67 37 (secrétariat)

Dr Sc Y Guiot, Responsable opérationnel, 02/764 67 37 (secrétariat)

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :
Professeur MC. Nollevaux, 081/42 30 11
Docteur A. Laka, 081/42 30 14

5.3 Analyses en biologie moléculaire

Les analyses de biologie moléculaire sont des analyses spécifiques, confiées en sous-traitance aux Centres qui en ont l'accréditation, la maîtrise, et avec le temps, l'expertise.
Elles sont généralement explicitement demandées par le prescripteur sur le formulaire de demande d'analyse, soit de manière libre, soit en cochant la case adéquate dans la liste des tests de biologie moléculaire proposés.

La mise au point anatomo-pathologique de certaines lésions du **col utérin** demande le recours à la biologie moléculaire afin de préciser l'éventuelle présence d'un virus **HPV** à haut risque.
En effet, une infection persistante par un HPV à haut risque entraîne, chez 5% des personnes qui en sont porteuses, le développement d'un carcinome épidermoïde.

Le diagnostic de certaines **néoplasies** (pulmonaires, coliques, mélanomateuses, hématologiques, de tissus mous...) implique le recours à la pathologie moléculaire afin d'évaluer l'éventuelle présence de mutations spécifiques qui ont un impact thérapeutique, pronostique et/ou prédictif pour le patient qui en est porteur.

N.B. Le formulaire de demande d'analyses pour les sous-traitances au laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques Saint-Luc à Woluwé se trouve dans le système qualité.

N.B. Le formulaire de demande d'analyses pour les sous-traitances au laboratoire de Microbiologie des Cliniques Saint-Luc à Woluwé se trouve dans le système qualité

5.3.1 Le typage HPV

La sous-traitance est confiée au Laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques Universitaires Saint-Luc à Woluwé.

Analyse accréditée BELAC ISO 15189 –2012 certificats n°369-MED

- HPV à partir de prélèvements de **cytologie anale en milieu liquide**
 - (Preservcyt®). Le flacon de Preservcyt® contenant le matériel résiduel après réalisation de l'analyse cytologique initiale est confié au laboratoire sous-traitant, accompagné d'une demande spécifique.
 - La durée maximale de préservation dans ce milieu est de trois mois.
 - La technique utilisée est une PCR de type *Real Time High Risk HPV de Abbott*
 - Le délai de réponse (TAT – jours ouvrables) est de 15 jours.

NB : Sont testés les sous-types d'HPV correspondant aux sous-types haut risque les plus fréquents. La réponse mentionne donc la présence ou l'absence d'un HPV à haut potentiel oncogène et seuls les sous-types HPV16 et HPV18 sont identifiés individuellement. L'éventuelle présence d'un HPV à faible risque oncogène n'est pas recherchée.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU, avec mention d'une recommandation.

Personnes de contact :

Pr C Galant, Chef de Service, 02/764 67 37 (secrétariat)

Dr Sc Y Guiot, Responsable opérationnel, 02/764 67 37 (secrétariat)

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Professeur M-C. Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

- HPV à partir de **prélèvements d'histologie**
 - Le bloc en paraffine à analyser est accompagné d'une lame colorée à l'hémalun-éosine.
 - La technique utilisée consiste en une hybridation in situ, sur automate Ventana.
 - Le délai de réponse (TAT – jours ouvrables) est de 10 jours.

NB : La réponse mentionne le résultat de la recherche d'HPV de bas risque et d'HPV de haut risque parmi une large sélection de sous-types d'HPV.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Personnes de contact :

Pr C Galant, Chef de Service, 02/764 67 37 (secrétariat)

Dr Sc Y Guiot, Responsable opérationnel, 02/764 67 37 (secrétariat)

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Professeur M-C. Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

5.3.2 La recherche par PCR des MYCOBACTERIES et tuberculosis et des BARTONELLA

La sous-traitance est confiée au Laboratoire de Microbiologie des Cliniques Universitaires Saint Luc à Woluwé.

Dans le cadre de la mise en évidence en histologie de pathologies granulomateuses nécrosantes, et en fonction du tableau clinique, il est demandé de rechercher la présence de mycobactéries ou de bartonella (griffes du chat).

L'analyse se fait à partir du bloc de paraffine.

L'envoi est adressé au Docteur Emmanuel ANDRE au Laboratoire de Microbiologie des Cliniques Universitaires Saint Luc, Tour Rosalind Franklin-2sud, avenue Hippocrate 10 à 1200 Bruxelles.

Il comporte :

- une lettre type de demande
- un tableau à remplir reprenant les nom et prénom du patient, le nombre de blocs confiés, le type d'analyse souhaitée, le nom du pathologiste référent au CHU, le nom du médecin prescripteur et la date de l'envoi
- dans le bas du tableau il est demandé de confirmer la réception du matériel au secrétariat d'anatomie pathologique du CHU
- une photocopie de la demande d'analyse qui reprend les données administratives du patient, dont le NISS

Le délai de réponse est de 2 semaines.

Le matériel confié est renvoyé après analyse.

Le résultat fait l'objet d'un compte rendu additionnel.

5.3.3 La recherche par PCR d'ADN d'ECHINOCOCCUS

Elle est confiée en sous-traitance au Laboratoire de Microbiologie Clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Liège (Unilab Lg).

Dans le cadre d'une suspicion d'échinococcose (hépatique), le bloc de paraffine est transmis au Laboratoire de Microbiologie Clinique du CHU de Liège, Domaine Universitaire du Sart Tilman – B35 – 4000 Liège.

Contact : Dr MP Hayette, 04 366 2428 (tél du laboratoire)

L'envoi comporte :

- une lettre type de demande
- une demande de confirmation de la réception du matériel au secrétariat d'anatomie pathologique du CHU
- une photocopie de la demande d'analyse qui reprend les données administratives du patient, dont le NISS

Le délai de réponse est de 10 jours à 2 semaines

Le matériel confié est renvoyé après analyse.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel.

5.3.4 L'analyse NGS (Next Generation Sequencing)

Elle est confiée en sous-traitance au Laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques St Luc à Woluwé.

Analyse accréditée BELAC ISO 15189-2012 certificat n°369-MED

Ci-dessous, les prescriptions de ce laboratoire concernant l'analyse susmentionnée, issues du formulaire de demandes d'analyse (formulaire de demande d'analyses extérieures, Form 4201 version 1.0 28/04/2023)

DANS LE CADRE D'UNE ANALYSE NGS : ces informations sont requises dans le cadre de l'article 33ter qui régit les analyses basées sur l'utilisation du NGS :

COM (oui /non, si oui date),

Localisation anatomique,

Diagnostic histologique,

Tumeur primaire ?, Tumeur métastatique ?

Doivent être mentionnés : le Centre demandeur (Pathologiste + Prescripteur), les coordonnées du Patient, des informations techniques concernant l'échantillon (date de prélèvement, référence centre demandeur, délai et durée de fixation).

En pratique :

- Les tests sont réalisés à partir de blocs en paraffine ; les tissus (biopsies ou pièces opératoires) ou « cell block » ayant été préalablement fixés au formaldéhyde 4% (ou formol 10 % tamponné).
- Le délai de fixation ne peut excéder 1 heure.
- La durée de fixation recommandée varie entre 6 et 48 heures.
- Pas de conditionnement particulier pour l'envoi des blocs (et de la lame HE).
- Joindre une copie du compte-rendu initial.
- Les prélèvements ne peuvent être teintés à l'éosine avant leur mise en cassette sous peine d'un risque majeur de non-contributivité de l'analyse à cause de l'autofluorescence du prélèvement.
- Les prélèvements ne peuvent avoir subi un passage dans du décalcifiant.
- Le matériel confié est renvoyé après analyse.
- Le résultat fera l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.
- Le médecin signataire est disponible pour tout renseignement complémentaire.
- Le délai de réponse (TAT – jours ouvrables) est de 10 jours.

Personnes de contact :

Pr C Galant, Chef de Service, 02/764 67 37 (secrétariat)

Dr Sc Y Guiot, Responsable opérationnel, 02/764 67 37 (secrétariat)

Recherche mutationnelle : **panel de 117 gènes impliqués en oncologie** (Capture Custom Panel TE-98036185_hg38 (Twist)).

ABL1,AKT1,AKT2,AKT3,ALK,APC,AR,ARAF,ARID1A,ATM,ATR,ATRX,BARD1,BCOR,BRAF,BRCA1,BRCA2,BRIP1,CND1,CCNE1,CD274,CDH1,CDK12,CDK4,CDK6,CDKN2A,CHEK1,CHEK2,CIC,CSF1R,CTNNB1,EGFR(HER1-ERBB1),ERBB2(HER2-NEU),ERBB3(HER3),ERBB4,ERCC2,ESR1,EZH2,FANCA,FANCL,FBXW7,FGFR1,FGFR2,FGFR3,FGFR4,FLI1,FLT3,FOXO1,FOXO3,GATA3,GNA11,GNA14,GNAQ,GNAS,H3F3A,HIST1H3B,HIST1H3C,HRAS,IDH1,IDH2,KDM6A,KIT,KRAS,MAP2K1(MEK1),MAP2K2,MAP3K3,MDM2,MET,MRE11A,MTOR,MYC,NF1,NOTCH1,NRAS,NRG1,NTRK1,NTRK2,NTRK3,PALB2,PBRM1,PDGFB,PDGFRA,PDGFRB,PIK3CA,PIK3R1,PIK3R2,POLD1,POLE,PPP2R2A,PRDM6,PTCH1,PTEN,RAC1,RAD51B,RAD51C,RAD51D,RAD54L,RAF1,RB1,RET,RICTOR,RNF43,ROS1,SDHA,SDHB,SDHC,SDHD,SMARCA4,SMARCB1,SMO,STK11(LKB1),SUFU,TEK,TERTpromoter,TP53,TSC1,TSC2,VHL ;

L'entière des 117 gènes est analysée, quel que soit le type de tumeur ou l'organe

- colorectal
- GIST
- Mélanome
- Neuro
- ORL
- Ovaire
- Pancréas
- Poumon
- Sein
- Thyroïde

➤ **Dans le cadre des cancers colo-rectaux**

La technique de NGS (next generation sequencing) permet d'optimiser la détection des altérations génétiques au sein des tumeurs ; à partir de blocs de paraffine et d'échantillons tumoraux de petite taille, des mutations dans des gènes impliqués dans la carcinogenèse ou des réarrangements peuvent être étudiés.

Par exemple, la présence de mutations du gène –RAS est liée à la résistance au traitement à base d'inhibiteurs anti-EGFR (panitumumab).

La présence de la mutation BRAF^{V600E} est exclusive de la mutation –RAS ; elle confère à la tumeur un mauvais pronostic.

Dans ce cadre, les guidelines et les directives ESMO... recommandent de tester tous les cancers colo-rectaux...

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Professeur MC. Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

➤ **Dans le cadre des GIST**

La recherche du statut mutationnel est indispensable à la prise de décision concernant la prescription d'un traitement adjuvant. La présence d'une mutation D842V du PDGFRA rend ce génotype insensible à la prise d'imatinib. Les patients ayant une mutation de l'exon 11 de KIT sont les plus à même de tirer profit de ce traitement. En cas de mutation de l'exon 9, la dose est adaptée.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Professeur MC. Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

➤ **Dans le cadre des cancers pulmonaires**

La technique de NGS (next generation sequencing) permet d'optimiser la détection des altérations génétiques au sein des tumeurs ; à partir de blocs de paraffine et d'échantillons tumoraux de petite taille (matériel biopsique ou cytologique), des mutations dans des gènes impliqués dans la carcinogenèse ou des réarrangements peuvent être étudiés.

Par exemple, des mutations activatrices du domaine tyrosine Kinase de l'EGFR situées dans les exons 18 à 21 ont été mises en évidence chez environ 10% des patients atteints de cancer du poumon non à petite cellules. Les patients porteurs de ces mutations présentent une meilleure réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI), ex. gefitinib.

D'autres mutations, particulièrement celles situées dans l'exon 20 sont quant à elles associées à une résistance aux EGFR-TKI.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

➤ **Dans le cadre du mélanome**

40 à 50% des mélanomes présentent une mutation du gène BRAF, dont 90% correspondent à une mutation du codon 600. Les patients porteurs d'un mélanome non résecable ou métastatique et qui présentent une mutation de BRAF sont susceptibles de bénéficier d'une thérapie ciblée (ex. vemurafenib).

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologiste référent au CHU UCL NAMUR :

Docteur I. Théate, 081/42 31 19

➤ **Dans le cadre de tumeurs gynécologiques**

Les mutations PIK3CA présentent un intérêt dans la réponse aux thérapies ciblées et peuvent expliquer une résistance à ces traitements.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologiste référent au CHU UCL NAMUR :

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

5.3.5 L'analyse par Polymerase Chain Reaction-PCR.

Elle est confiée en sous traitance au Laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques St Luc à Woluwé.

Analyse accréditée BELAC ISO 15189-2012 certificat n°369-MED

Aspects pratiques généraux.

Les analyses s'effectuent à partir de blocs en paraffine.

Le CHU confie une lame HE et le bloc de paraffine (renvoyés après analyse), accompagnés d'une demande d'analyse bien complétée et d'une copie du compte-rendu initial.

Les prélèvements doivent être fixés dans du formol 10% tamponné, pour une durée comprise idéalement entre 6 et 48h.

Les prélèvements ne peuvent être teintés à l'éosine avant leur mise en cassette sous peine d'un risque majeur de non-contributivité de l'analyse à cause de l'autofluorescence du prélèvement.

Les prélèvements ne peuvent avoir subi un passage dans du décalcifiant.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Le délai de réponse (TAT-jours ouvrables) est de 15 jours.

Personnes de contact :

Pr C Galant, Chef de Service, 02/764 67 37 (secrétariat)

Dr Sc Y Guiot, Responsable opérationnel, 02/764 67 37 (secrétariat)

➤ **Dans le cadre des MSI (instabilité des microsatellites)**

cf. point 5.2 « Analyses combinées immunohistochimie et biologie moléculaire ».

➤ **Dans les NEOPLASIES HEMATOLOGIQUES**

Dans le cadre d'une hémopathie, il est parfois nécessaire de recourir à la mise en évidence d'un réarrangement monoclonal du gène du récepteur T (« lymphomes T ») ou d'un réarrangement monoclonal des gènes d'immuno-globulines (« lymphomes B »)

Pathologiste référent au CHU UCL NAMUR :

Docteur I. Théate, 081/42 31 19

5.3.6 L'analyse par HYBRIDATION IN SITU –FISH, SISH.

Elle est confiée en sous traitance au Laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques Saint Luc à Woluwé.

Analyse accréditée BELAC ISO 15189 –2012 certificat n°369-MED

Aspects pratiques généraux.

Les analyses s'effectuent à partir de blocs en paraffine.

Le CHU confie une lame HE (ou une lame de coloration immuno-histochimique) et le bloc de paraffine (renvoyés après analyse), accompagnés d'une demande d'analyse bien complétée et d'une copie du compte-rendu initial.

Les prélèvements doivent être fixés dans du formol 10% tamponné, pour une durée comprise idéalement entre 6 et 48h.

Les prélèvements ne peuvent être teintés à l'éosine avant leur mise en cassette sous peine d'un risque majeur de non-contributivité de l'analyse à cause de l'autofluorescence du prélèvement.

Les prélèvements ne peuvent avoir subi un passage dans du décalcifiant.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Le délai de réponse (TAT-jours ouvrables) est de 10 jours.

Personnes de contact :

Pr C Galant, Chef de Service, 02/764 67 37 (secrétariat)

Dr Sc Y Guiot, Responsable opérationnel, 02/764 67 37 (secrétariat)

➤ **REARRANGEMENT de ALK par FISH**

Les réarrangements du gène ALK (anaplastic lymphoma kinase) sont des altérations génétiques observées dans différents types de cancers pulmonaires dont les NSCLC.

La présence d'un tel réarrangement est associée à une réponse thérapeutique par ex. au crizotinib, un inhibiteur de ALK.

Cette analyse est réalisée uniquement si l'immuno ALK est positive.

Analyse ALK (2p23) Break Apart (accréditée BELAC ISO 15189-2012 N° 369-MED)

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

➤ **REARRANGEMENT de ROS-1 par FISH**

Les réarrangements du gène ROS1 sont des altérations génétiques observées dans différents types de cancers pulmonaires dont les NSCLC. La présence d'un tel réarrangement serait associée à une réponse thérapeutique au crizotinib.

Cette analyse est réalisée uniquement si l'immuno ROS1 est positive.

Analyse ROS1 (6q22) Break Apart (accréditée BELAC ISO 15189-2012 N° 369-MED)

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

➤ *Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :*

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

➤ **Les NEOPLASIES HEMATOLOGIQUES**

Dans le cadre du diagnostic d'une hémopathie, il est parfois nécessaire de recourir à des analyses de gènes pour rechercher des réarrangements chromosomiques par ex. BCL2 (18q21), BCL6 (3q27), C-MYC (8q24)...

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologiste référent au CHU UCL NAMUR:

Docteur I. Théate, 081/42 31 19

➤ **L'amplification de MDM2**

Elle est présente dans les tumeurs lipomateuses atypiques et les liposarcomes bien différenciés et absente dans les lipomes.

MDM2 (12q15)

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologiste référent au CHU UCL NAMUR :

Docteur I. Théate, 081/42 31 19

➤ **La recherche d'EBV (EBER)**

L'expression du virus EBV est potentiellement recherchée dans des lymphomes, ou des pathologies non hématologiques (ex. cancers sphère ORL...)

Analyse par SISH (automate Benchmark, Ventana)

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologiste référent au CHU UCL NAMUR :

Docteur I. Théate, 081/42 31 19

➤ LA RECHERCHE D'AMPLIFICATION DU GENE HER2

L'amplification du gène HER2/Neu est associée à un moins bon pronostic pour les patients atteints d'un carcinome mammaire ou gastrique ou du bas œsophage.

La présence de cette amplification est associée à une réponse thérapeutique à un anti HER2/Neu (ex.Trastuzumab).

- S'effectue à partir de blocs en paraffine
- Les lames d'immunohistochimie déterminant le score de la protéine Her-2/Neu doivent être envoyées en même temps que le bloc.
- La technique correspond à la méthode Silver in situ hybridation (SISH) Automate Benchmark, Ventana.

Le résultat fait l'objet d'un compte-rendu additionnel au CHU.

Pathologistes référents au CHU UCL NAMUR :

Professeur M-C. Nollevaux, 081/42 30 11

Docteur A. Laka, 081/42 30 34

6. Référence des documents utilisés

- Le formulaire de demande d'analyses pour les sous-traitances au laboratoire d'Anatomie Pathologique des Cliniques Saint-Luc à Woluwé.
- Le formulaire de demande d'analyses pour les sous-traitances au laboratoire de Microbiologie des Cliniques Saint-Luc à Woluwé.