

HOPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE - HOPITAL BEAUJON

100, BOULEVARD DU GENERAL LECLERC, 92110 CLICHY CEDEX Standard : 01 40 87 50 00 - International : 33 1 40 87 50 00

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET GENETIQUE MOLECULAIRE (PR M. VIDAUD)

Contact : Dr D.VIDAUD ou N.THEOU-ANTON - tel : 01 40 87 51 83/Fax 01 40 87 53 84

SERVICE DE PATHOLOGIE (PR P. BEDOSSA)

Contact : Dr N.GUEDJ - tel secrétariat : 01 40 87 54 59 /Fax: 01 40 87 00 77

BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN GENETIQUE MOLECULAIRE

PATIENT	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
Nom :	Née :	
Prénom :	Date de naissance :	

PATHOLOGISTE DEMANDEUR
NOM :
ADRESSE :
Tél : Fax :

EXAMEN DEMANDE : Colon : <input type="checkbox"/> Poumons : <input type="checkbox"/> Autre :
Cochez-ici
<input type="checkbox"/> Recherche mutations du gène KRAS exon 2 et 3
<input type="checkbox"/> Recherche mutations du gène KRAS exon 2 et 3
<input type="checkbox"/> Recherche mutations du gène PI3KCA exon 9 et 20
<input type="checkbox"/> Recherche mutations du gène BRAF exon 11 et 15
<input type="checkbox"/> Recherche mutations du gène EGFR exon 18, 19, 20 et 21
<input type="checkbox"/> Recherche phénotype RER (MSI)
DATE DE LA DEMANDE :/...../..... CONTEXTE DE LA DEMANDE : Urgent : <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non

MATERIEL TRANSMIS : <i>Merci de joindre une copie du compte rendu anapath</i>
FIXATEUR UTILISE (sauf liquide de Bouin et ceux à base acide picrique) :
N° de dossier et n° de bloc transmis :
Type de prélèvement : <input type="checkbox"/> Biopsie <input type="checkbox"/> Pièce opératoire <input type="checkbox"/> Autres :
Nature (coupes, blocs, lames....) :

PRECISER DANS LA ZONE SELECTIONNEE POUR ANALYSE
% de noyaux de cellules tumorales :
% superficie de plages acellulaires colloïde : nécrose : fibrose :
Pathologiste validant l'analyse morphologique :

CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises)
NOM :
ADRESSE :
Tél : Fax :

RECOMMANDATIONS DE TRANSPORT ET DELAI DE RENDU DE RESULTAT
Voir fiche pratique

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

HOPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE - HOPITAL BEAUJON

100, BOULEVARD DU GENERAL LECLERC, 92110 CLICHY CEDEX Standard : 01 40 87 50 00 - International : 33 1 40 87 50 00

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET GENETIQUE MOLECULAIRE (PR M. VIDAUD)

Contact : Dr D.VIDAUD ou N.THEOU-ANTON - tel : 01 40 87 51 83/ Fax 01 40 87 53 84

SERVICE DE PATHOLOGIE (PR P. BEDOSSA)

Contact : Dr N.GUEDJ - tel secrétariat : 01 40 87 54 59 /Fax: 01 40 87 00 77

Informations pratiques concernant la recherche du statut mutationnel de l'exon 2 et 3 du gène KRAS⁽¹⁾, de l'exon 2 et 3 du gène NRAS⁽¹⁾, de l'exon 9 et 20 de PI3KCA⁽¹⁾, de l'exon 11 et 15 du gène BRAF^(2,3) et du statut MSI⁽³⁾ dans les adénocarcinomes du colon

Pour quels patients :

Patients atteints de cancer colorectal métastatique (1 et 2).

Patients nécessitant une détermination du statut MSI/BRAF dans le cadre d'une consultation d'oncogénétique (3)

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Colon/ Adénocarcinome - K-RAS/mutations » de l'APHP.

Dans quels buts :

(1) Définir l'éligibilité à un traitement ciblé anti EGFR par Cetuximab ou Panitumumab. Actuellement, seule la présence de mutations sur les codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS a été démontré comme prédictive d'une absence de réponse au traitement et leur recherche obligatoire avant la mise en route d'un traitement par Cetuximab ou Panitumumab.

(2) Valeur pronostic a priori péjorative de la mutation Val 600Glu de BRAF dans les CCR en situation adjuvante ou métastatique

(3) Identifier un éventuel syndrome HNPCC

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Colon/ Adénocarcinome - K-RAS/mutations » de l'AP-HP.

Sur quels prélèvements :

Tumeur primitive ou localisation métastatique fixée (préférentiellement formol, le liquide de Bouin est formellement exclu) et incluse en paraffine.

Le prélèvement doit comporter **plus de 25%** de cellules tumorales (par rapport au nombre total de cellules du prélèvement). Cette donnée chiffrée doit être indiquée dans la fiche de prescription pour une interprétation pertinente des résultats.

Où adresser sa demande :

Votre demande sera traitée à l'hôpital Beaujon.

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

Référent : **Dr N.GUEDJ** - nathalie.guedj@bjn.aphp.fr

Laboratoire : **Service d'anatomo-pathologie**

Hôpital Beaujon - 100 Bld du Général Leclerc - 92110 CLICHY cdx

Tél Réception : **01 40 87 41 61/ Fax: 01 40 87 00 77**

➔ Les coupes de tissus seront ensuite adressées, par l'anatomo pathologiste de la plateforme à son correspondant biologiste moléculaire, au laboratoire de génétique moléculaire qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation :

Référents : **Dr D. VIDAUD** - dominique.vidaud@bjn.aphp.fr
Dr N. THEOU-ANTON - nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr
Dr B. PARFAIT - beatrice.parfait@bjn.aphp.fr

Laboratoire : **Laboratoire de Biochimie et Génétique moléculaire**
UF de génétique Moléculaire
Hôpital Beaujon - 100 Bld du Général Leclerc - 92110 CLICHY cdx
Tel Réception : **01 40 87 53 70/ fax 01 40 87 53 84**

Que faut-il envoyer :

→ au service d'anatomo-pathologie :

- le bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales (par rapport aux cellules totales de l'échantillon)
- le compte rendu d'anatomo pathologie correspondant au prélèvement
- 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.
- la fiche de dédommagement pour désarchivage, le cas échéant.

Le laboratoire d'anatomie pathologique transmet au laboratoire d'oncologie moléculaire, le dossier administratif et les copeaux du prélèvement dûment identifié pour analyse.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement en anatomie pathologique, un délai maximum de **15 jours** est à prévoir. Le résultat est adressé aux correspondants qui seront mentionnés dans le Bon de demande d'examen. Le résultat est signé par les référents biologistes moléculaires.

En cas de situation d'urgence, la mention **URGENT** sur le Bon de demande d'examen permet de réduire le délai de rendu au maximum.

Le bloc tumoral vous sera réadressé secondairement par le service d'anatomo-pathologie.

Quelles techniques utilisons-nous ?

→ au service d'anatomie pathologique :

- le bloc tumoral sera coupé et analysé en HES pour sélection de la zone la plus richement tumorale (la richesse tumorale pourra être augmentée par macrodissection).

- Si la biopsie fixée est de taille importante (>1x1cm) : La paraffine sera retirée au maximum avant de réaliser 5 coupes de 5µm

- Si la biopsie fixée est de faible taille (moins de 1x1cm) : La paraffine sera retirée au maximum avant de réaliser 10 coupes de 5µm

- Si la biopsie fixée correspond à une tête d'épingle, la paraffine sera fondue et la biopsie placée directement dans un tube de 1,5 ml

- Statut MSI : IHC hMLH1, hMSH2 et hMSH6

→ au service de génétique moléculaire:

- l'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée sur colonne Qiagen après traitement de la coupe paraffinée par la protéinase K.

- l'analyse systématique se fait en duplicate, par la technique HRM sur LC480 (Roche) (technique sensible de 5 à 10%), suivie si mutation par un séquençage des produits d'amplification HRM pour déterminer le type de mutation. Cette technique est une méthode de sensibilité intermédiaire mais sans a priori sur la mutation à détecter.

- Statut MSI : Analyse de fragment à l'aide des marqueurs microsatellites validés BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27.

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Côlon / Endomètre /Adénocarcinome	<i>Phénotype MSI</i>

But : Identification des sujets atteints d'un syndrome de Lynch

Identifier les patients atteints d'un cancer colorectal ou d'un cancer de l'endomètre avec instabilité microsatellitaire, afin d'identifier les sujets susceptibles d'être atteints d'un syndrome de Lynch (ou syndrome HNPCC) et devant bénéficier d'une consultation d'oncogénétique.

Indications

Analyse nécessaire (Expertise collective) : tous les patients atteints d'un cancer colorectal âgés de moins de 60 ans, les patients ayant un antécédent au 1er degré d'une tumeur du spectre étroit du syndrome de Lynch (cancer de l'endomètre, de l'intestin grêle, des voies urinaires excrétrices) quelque soit l'âge, et tous les patients ayant développé deux tumeurs du spectre étroit.

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.

- Prélèvements tumoraux (pièce opératoire ou biopsie), primitif ou métastase
- De préférence sur blocs de tumeur fixée en formol tamponné pendant moins de 48h.
- Contrôle histologique indispensable de la cellularité de l'échantillon tumoral.
- Macrodissection sur lame nécessaire si <20% de cellules tumorales (Le compte rendu doit indiquer le % de cellules tumorales présentes sur la lame sur laquelle la macrodissection a été réalisée).

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).

Deux techniques sont possibles :

1. Une technique de biologie moléculaire qui teste 5 marqueurs quasi monomorphes dans la population générale. Il s'agit d'une amplification par PCR de 5 marqueurs, le produit d'amplification est révélé par une électrophorèse. Le résultat est positif si au moins 3 des 5 marqueurs présentent une instabilité génétique.
2. Une technique immunohistochimique qui teste la perte d'expression des 4 protéines de la réparation des mésappariements de l'ADN impliquées dans la survenue du syndrome de LYNCH (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) : une perte d'expression par les cellules tumorales d'au moins une de ces protéines indique la positivité du phénotype.

La place respective de ces deux tests reste discutée. Les deux techniques ont des limitations (faux négatifs) qui nécessitent une analyse critique en cas de discordance entre une histoire clinique personnelle ou familiale évocatrice d'un syndrome de prédisposition et un résultat négatif par l'une des techniques.

Délai moyen de rendu de résultat

30 jours

Informations complémentaires

Références (sur les indications et les techniques)

1. Olschwang et al. Identification et prise en charge du syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colon cancer), Prédisposition héréditaire aux cancers du côlon, du rectum et de l'utérus.
Bull Cancer 2004 ; 91 (4) : 303-15
2. Vasen et al.
Recommendations to improve identification of hereditary and familial cancer in Europe.
Fam Cancer 2010;9:109-15

Auteurs

• Rédacteurs V1 : P. Laurent-Puig, JF. Flejou, Y. Parc	le 15/06/2010
• Relecteurs : S. Chaussade	le 18/08/2010
• Validation Comité de Coordination	le 06/10/2010