

**HOPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE  
(BICHAT - LOUIS MOURIER - BEAUJON - BRETONNEAU - RICHERT)**

46, RUE HENRI HUCHARD, 75877 PARIS Cedex 18

STANDARD : 01 40 25 80 80 INTERNATIONAL : 331 40 25 83 05

**DEPARTEMENT DE GENETIQUE** (Pr B.GRANDCHAMP) - CONTACT : Dr N. THEOU-ANTON - Dr J.LAMORIL - Pr. N. SOUFIR TEL SECRETARIAT : 01 40 25 88 51/FAX : 01.40.25.87.85

**DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE** (Pr. P. BEDOSSA) - CONTACT : Pr.A COUVELARD (BICHAT - TEL : 01 40 25 80 03) - Dr N.GUEDJ (BEAUJON - TEL : 01 40 87 54 59) - Dr M.GROSSIN (LOUIS MOURIER - TEL : 01 47 60 62 61)

**BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE**

<b>PATIENT (ou ETIQUETTE)</b>	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
-------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------

Nom : \_\_\_\_\_ Née : \_\_\_\_\_

Prénom : \_\_\_\_\_ Date de naissance : \_\_\_\_\_

**PATHOLOGISTE DEMANDEUR**

NOM : .....

ADRESSE : .....

Tél : ..... Fax : .....

**PRESCRIPTION**

DATE DE LA DEMANDE : ..... / ..... / ..... CONTEXTE DE LA DEMANDE : Urgent :  oui  non

**Cochez-ici**

- Recherche d'une instabilité de microsatellite (MSI)/ phénotype RER
- Recherche de mutations du gène KRAS exon 2 (dont codon 12 et 13) et exon 3 (dont codon 61)
- Recherche de mutations du gène NRAS exon 2 (dont codon 12 et 13) et exon 3 (dont codon 61)
- Recherche de mutations du gène PI3KCA exon 9 et 20
- Recherche de mutations du gène BRAF exon 11 et 15 (dont V600E)
- Recherche de mutations du gène CKIT exon 9, 10, 11, 13 et 17
- Recherche de mutations du gène EGFR exon 18, 19, 20 et 21

**ORIGINE DU PRELEVEMENT**

*Merci de joindre une copie du compte rendu anapath*

Colon       Poumon       Mélanome      Autre : .....

N° de CR anapath et n° de bloc : .....

% de cellules tumorales : .....

Type histologique de la tumeur : .....

Type de prélèvement :  Biopsie       Pièce opératoire       Cytologie (culot)       Autres :

Tissu fixé (bloc paraffine) :

**COLON, POUMON ou MELANOME**

- Si >30% de cellules tumorales : 10 coupes de 10µm (copeaux dans un tube).
- Si <30% de cellules tumorales : 10 coupes de 10µm sur lames. Cerclez la zone d'intérêt avant envoi (+1HPS annoté).

Tissu congelé : Faire 10 coupes de 10 µm de tissu congelé minimum (ou environ 3 à 5 mm<sup>3</sup>) dans un cryotube (à envoyer dans la carboglace ou l'azote).

**CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises)**

NOM : .....

ADRESSE : .....

Tél : ..... Fax : .....

## FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

### HOPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE (BICHAT - LOUIS MOURIER - BEAUJON - BRETONNEAU - RICHET)

46, RUE HENRI HUCHARD, 75877 PARIS Cedex 18

STANDARD : 01 40 25 80 80 INTERNATIONAL : 331 40 25 83 05

DEPARTEMENT DE GENETIQUE (Pr B.GRANDCHAMP) - CONTACT : DR N. THEOU-ANTON - DR J.LAMORIL - Pr. N. SOUFIR  
TEL SECRETARIAT : 01 40 25 88 51/FAX : 01.40.25.87.85

DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE (Pr. P. BEDOSSA) - CONTACT : DR.A COUVELARD (BICHAT - TEL : 01 40 25 80 03) - DR  
N.GUEDJ (BEAUJON - TEL : 01 40 87 54 59) - DR M.GROSSIN (LOUIS MOURIER - TEL : 01 47 60 62 61)

### Informations pratiques concernant la recherche du statut mutationnel de KRAS et BRAF dans les adénocarcinomes du colon

#### Pour quels patients :

Patients atteints de cancer colorectal métastatique.

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

#### Dans quels buts :

Définir l'éligibilité à un traitement ciblé anti EGFR par Cetuximab ou Panitumumab

La présence de mutations sur les exons 2 (codons 12, 13) et 3 (codon 61) est prédictive d'une non réponse au traitement.

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

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 30%** 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 Bichat** par le département de Génétique Moléculaire pour l'analyse moléculaire après envoi des prélèvements par le service d'anatomie pathologique.

#### Services d'anatomie pathologique des Hôpitaux extérieurs ou privés

Après validation et préparation des échantillons, les coupes de tissus seront ensuite adressées, par l'anatomopathologiste référent au correspondant biologiste moléculaire du département de Génétique Moléculaire à Bichât qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation (voir ci-dessous les coordonnées).

#### Services d'anatomie pathologique des Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine

→ Le prélèvement sera initialement réceptionné, validé et préparé pour l'analyse moléculaire par le laboratoire d'anatomie pathologique référent selon les sites :

**Département d'Anatomie Pathologique - Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine**

HOPITAL BEAUJON	HOPITAL BICHAT	HOPITAL LOUIS MOURIER
<b>Référent :</b> Dr N. GUEDJ 100, boulevard du Général Leclerc 92110 Clichy Réception : 01 40 87 54 59	<b>Référent :</b> Dr M. HOURSEAU 46 rue Henri Huchard 75018 Paris Réception : 01 40 25 80 03	<b>Référent :</b> Dr M. GROSSIN 178 rue des Renouillers 92700 Colombes Réception : 01 47 60 62 59

→ Les coupes de tissus seront ensuite adressées, par l'anatomopathologiste du groupe hospitalier au correspondant biologiste moléculaire du département de Génétique Moléculaire qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation :

**Référents :** [Dr Nathalie Théou-Anton](mailto:nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr) ([nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr](mailto:nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr))  
[Dr Jérôme Lamoril](mailto:jerome.lamoril@bch.aphp.fr) ([jerome.lamoril@bch.aphp.fr](mailto:jerome.lamoril@bch.aphp.fr))  
[Pr Nadem Soufir](mailto:nadem.soufir@bch.aphp.fr) ([nadem.soufir@bch.aphp.fr](mailto:nadem.soufir@bch.aphp.fr))

**Laboratoire :** Département de Génétique Moléculaire  
 Hôpital Bichat  
 46 rue Henri Huchard  
 75877 Paris cedex 18  
 Réception: **01.40.25.88.51 / fax 01.40.25.87.85**

### Que faut-il envoyer :

→ Si envoi des blocs directement à un service d'anatomie pathologique des Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine

- Le bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales (par rapport aux cellules totales de l'échantillon)
- Le **compte rendu d'anatomopathologie** 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.

Le laboratoire d'anatomie pathologique transmet au Département de Génétique Moléculaire, une copie du dossier administratif et les copeaux du prélèvement dûment identifié pour analyse.

→ Si envoi des copeaux du prélèvement directement au département de Génétique Moléculaire :

- 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.
- le **compte rendu d'anatomopathologie** correspondant au prélèvement
- Les **copeaux du prélèvement** dûment identifié pour analyse
- la **fiche de dédommagement** pour désarchivage, le cas échéant.

### Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement au laboratoire de génétique, 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 ré adressé secondairement par le service d'anatomie pathologique.

## 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).
- Plusieurs situations sont possibles, fonction du % de cellules tumorales de l'échantillon :

#### - Si >30% de cellules tumorales :

Retirer la paraffine au maximum avant de réaliser 5 coupes de 10µm et les placer dans un tube de 1,5ml (type microtube à centrifuger TREFF 1,5 ml click-cap, Ref 8288601, VWR)

#### - Si <30% de cellules tumorales :

Réaliser 5 coupes de 10µm sur lames. Cerceler la zone d'intérêt avant envoi (1HPS annoté).

### → 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 par la technique PCR-HRM (High Resolution Melting) sur LightCycler 480 suivi le cas échéant, du séquençage sur ABI 3130 (Applied Biosystems). Cette analyse porte sur les exons 2 et 3 du gène codant pour KRAS (dont les codons 12, 13 et 61).

## FICHE MEDICALE

<b>Pathologie</b>	<b>Analyse</b>
Colon / Adénocarcinome	<i>KRAS / mutations</i>

### **But : Accès à une thérapie ciblée**

Identifier les patients atteints de carcinome colorectal qui pourront bénéficier d'un traitement par anticorps anti-EGFR. En effet, seuls les patients non mutés peuvent bénéficier d'un traitement par Ac anti-EGFR.

### **Indications**

Analyse nécessaire : Pour les patients métastatiques (stade IV, M+) avant 1ère à nième ligne de chimiothérapie.

Analyse exploratoire : Patients stade III avec risque élevé de rechute ; Patients stade I, II et III.

### **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 la cellularité tumorale est inférieure à la sensibilité théorique de la méthode de dépistage, de façon à enrichir le prélèvement analysé en cellules tumorales (le compte rendu doit indiquer le % de cellules tumorales après macrodissection présentes sur la lame).

### **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).

1. Discrimination allélique : détection des 7 mutations les plus fréquentes des exons 12 et 13 de KRAS
2. HRM + séquence

### **Délai moyen de rendu de résultat**

7-14 jours

### **Informations complémentaires**

Les 7 mutations les plus fréquentes concernent les codons 12 et 13. Il est clairement établi que ces mutations confèrent une résistance au panitumumab (1) et au cetuximab (2-4), et elles doivent être impérativement recherchées :

- Codon 12: p.G12D, p.G12A, p.G12V, p.G12S, p.G12R, p.G12C
- Codon 13 : p.G13D

Les codons 61 et 146 peuvent également faire l'objet de mutations. Celles-ci sont beaucoup plus rares et de ce fait les données cliniques sont limitées. D'après (Loupakis) les patients présentant ces altérations ne répondent pas aux anti-EGFR. Toutefois un nombre trop

restreint de patients a été étudié. Aussi, ces premières observations nécessitent d'être confirmées par des études cliniques prospectives.

### Références (sur les indications et les techniques)

1. Bibeau F, Frugier H, Denouel A, Sabourin JC, Boissiere-Michot F.  
Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The pathologist's point of view.  
*Bull Cancer.* 2009 Dec;96 Suppl:S15-22. French.
2. Blons H, Laurent-Puig P.  
Technical considerations for KRAS testing in colorectal cancer. The biologist's point of view  
*Bull Cancer.* 2009 Dec;96 Suppl:S47-56. Review. French
3. Chang YS, Yeh KT, Hsu NC, Lin SH, Chang TJ, Chang JG.  
Detection of N-, H-, and KRAS codons 12, 13, and 61 mutations with universal RAS primer multiplex PCR and N-, H-, and KRAS-specific primer extension.  
*Clin Biochem.* 43(3):296-301.
4. Edkins S, O'Meara S, Parker A, Stevens C, Reis M, Jones S, et al.  
Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer.  
*Cancer Biol Ther.* 2006;5(8):928-32.
5. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al.  
KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer.  
*Br J Cancer* 2009;101(4):715-721.

### Auteurs

- |   |                |
|---|----------------|
| • Rédacteurs V1 : JF. Emile, T. André, P.Laurent-Puig | le 15/06/2010  |
| • Relecteurs : S. Chaussade, C. Guettier, JF Fléjou   | le 18/08/2010  |
| • Validation Comité de Coordination                   | le 06/10 /2010 |