

**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** : 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

PATIENT (ou ETIQUETTE)	<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

<input type="checkbox"/> Colon	<input type="checkbox"/> Poumon	<input type="checkbox"/> Mélanome	Autre :
N° de CR anapath et n° de bloc :			
% de cellules tumorales :			
Type histologique de la tumeur :			
Type de prélèvement : <input type="checkbox"/> Biopsie <input type="checkbox"/> Pièce opératoire <input type="checkbox"/> Cytologie (culot) <input type="checkbox"/> Autres :			
<input type="checkbox"/> Tissu fixé (bloc paraffine) :			
COLON, POU MON ou MELANOME			
<input type="checkbox"/> Si >30% de cellules tumorales : 10 coupes de 10µm (copeaux dans un tube).			
<input type="checkbox"/> Si <30% de cellules tumorales : 10 coupes de 10µm sur lames. Cercler la zone d'intérêt avant envoi (+1HPS annoté).			
<input type="checkbox"/> Tissu congelé : Faire 10 coupes de 10 µm de tissu congelé minimum (ou environ 3 à 5 mm3) 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 - RICHT)

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 BRAF, NRAS et C-KIT dans les mélanomes

Pour quels patients :

Patients atteints de mélanome.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Peau/ Mélanome malin (SAI)/Mutation » de l'AP-HP.

Dans quels buts :

- Définir l'éligibilité à un traitement ciblé par le Vémurafénib (inhibiteur de BRAF)
- Définir l'éligibilité à de nouveaux traitements ciblés (inhibiteurs de NRAS ou d'autres molécules de la voie MAP kinase, PI3 kinase ou d'autres voies métaboliques impliquées dans le mélanome).
- Dans le cas de mélanome acral ou muqueux, une mutation activatrice peut être retrouvée dans le gène C-KIT (exons 9, 11, 13 et 17). La recherche de mutations dans ces régions du gène permet de définir l'éligibilité à un traitement ciblé par l'imatinib, le sunitinib, nilotinib ou le dasatinib.

Sur quels prélèvements :

Tumeur primitive ou localisation métastatique **fixée** (préférentiellement formol tamponné, le liquide de Bouin est formellement exclu) et incluse en paraffine (10 coupes de 10 microns) **ou tumeur congelée** (10 coupes de 10 microns en cryotube).

Envoyer soit des copeaux (dans un tube eppendorf) soit des lames blanches (5-10 lames et une lame avec coloration HPS annotée).

En cas de tumeur congelée, envoyer dans de la carboglace ou l'azote.

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 pour l'analyse moléculaire après envoi par le service d'anatomie pathologique de l'hôpital où sera réceptionné, validé et préparé l'échantillon (Bichat, Beaujon ou Louis Mourier).

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

Département d'Anatomie Pathologique – Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine	
HOPITAL BEAUJON	HOPITAL BICHAT
Référent : Dr N. GUEDJ 100, boulevard du Général Leclerc 92110 Clichy Réception : 01 40 87 54 59	Référent : Dr L.DESCHAMPS – Dr E. MARINHO 46 rue Henri Huchard 75018 Paris Réception : 01 40 25 80 03

➔ 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 \(nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr\)](#)
[Dr Jérôme Lamoril \(jerome.lamoril@bch.aphp.fr\)](#)
[Pr Nadem Soufir \(nadem.soufir@bch.aphp.fr\)](#)

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 (ou lames) 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'anatomo pathologie** correspondant au prélèvement
- Les **copeaux (ou lames) 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).
- faire 10 coupes de 10 µm soit sur lames (+1HPS annoté) soit en copeaux dans un tube et transmettre au laboratoire de génétique moléculaire

➔ Au service de génétique moléculaire:

- L'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.
- L'analyse moléculaire se fait par différentes techniques :
 - Génotypage V600 (gène BRAF) :
 - PCR LNA spécifique d'allèle
 - PCR-HRM (High Resolution Melting) de l'exon 15 du gène BRAF sur LightCycler 480 suivi le cas échéant, du séquençage sur ABI 3130 (Applied Biosystems).
 - Analyse des exons 2 et 3 (dont les codons 12, 13 et 61) du gène codant pour NRAS
 - PCR-HRM (High Resolution Melting) sur LightCycler 480 suivi le cas échéant, du séquençage sur ABI 3130 (Applied Biosystems).
 - Analyse des mutations du gène codant pour cKIT
 - Séquençage des exons 9, 11, 13 et 17.

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Mélanome	<i>BRAF / mutations</i>

But : Accès à une thérapie ciblée

Identifier les patients atteints de mélanome qui pourront bénéficier d'un traitement par un inhibiteur de BRAF.

Indications

Analyse nécessaire : Pour les patients adultes atteints d'un mélanome cutané localement évolué inopérable ou métastatique porteur d'une mutation BRAF V600.

Analyse nécessaire (expertise collective) : Mélanome avec atteinte ganglionnaire; mélanome avec métastases à distance

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, biopsie,...) sur lésion primitive ou métastatique. La recherche de mutation est généralement plus facile sur les métastases ganglionnaires ou à distance, en raison de la petite taille des tumeurs primitives.
- De préférence sur prélèvement fixé en formol tamponné pendant moins de 48H.
- Contrôle histologique indispensable permettant d'indiquer le pourcentage de cellules tumorales
- Macrodissection sur lame préférable si moins de 50% de cellules tumorales.

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. Séquençage des produits d'amplification (méthode de Sanger ou pyroséquençage).
2. Discrimination allélique par PCR temps réel : détection des 2 mutations les plus fréquentes V600E et V600K
3. HRM + séquençage des produits de PCR

Délai moyen de rendu de résultat

7 à 15 jours

Informations complémentaires

Le mélanome métastatique est une affection de pronostic redoutable (médiane de survie 6,2 mois). La chimiothérapie de référence, le Dédicène®, permet d'obtenir des taux de réponse de 7.5% de courte durée. L'ipilimumab, anticorps monoclonal anti CTLA4, augmente la survie de patients prétraités de 30%. Environ 40 à 50% des mélanomes métastatiques

présentent des mutations activatrices sur le gène *BRAF*. La quasi-totalité des mutations de *BRAF* des mélanomes sont localisées sur le codon 600, et les 2 mutations les plus fréquentes sont la V600E (74%) et la V600K (20%) (Long et al. J Clin Oncol 2011).

Plus de la moitié des patients porteurs de la mutation V600 sont répondeurs aux inhibiteurs de *BRAF* (Flaherty et al. 2010). Le vemurafenib a obtenu l'AMM le 17 février 2012 pour le traitement des patients atteints de mélanome non résectable ou métastatique avec mutation *BRAF* V600. Les dernières données de BRIM3 (1^{ère} ligne) et BRIM2 (2^{ème} ligne) montrent une survie globale médiane entre 13 et 16 mois sous vemurafenib (Zelboraf®).

Le Dabrafénib (Tafinlar®) est également disponible dans la même indication depuis novembre 2014 avec des résultats comparables. Des associations de *BRAF* et MEK inhibiteurs sont en cours d'évaluation.

Références (sur les indications et les techniques)

1. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB.
Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma
N Engl J Med. 2010; Aug 26;363 (9):809-19.
2. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R et al
Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib
N Engl J Med. 2012 ; february 23; 366 (8) : 707-14
3. Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al
Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation
N Engl J Med. 2011 ; june 5; 364 : 2507-16

Auteurs

- | | |
|---|---------------|
| • Rédacteurs V3 : S. Mourah, C. Lebbé, J.F. Emile | Le 26/05/2014 |
| • Relecteurs : M.F. Avril, B. Crickx, E. Maubec | Le 27/05/2014 |
| • Validation Comité de Coordination | Le 27/05/2014 |