

**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)

☐ Monsieur

☐ 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, POU MON 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. Cercler 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 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 - RICHEL)

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 EGFR dans les cancers non à petites cellules du Poumon

Pour quels patients :

Patients atteints de carcinome bronchique non à petites cellules.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Poumon/ Carcinome bronchique - EGFR » de l'AP-HP.

Dans quels buts :

Définir l'éligibilité à un traitement ciblé inhibiteur de kinase EGFR par Gefitinib ou Erlotinib

La présence de mutations dans les exons 19 et 21 (plus rarement 18 et 20) constitue des mutations activatrices prédictives d'une réponse au traitement.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Poumon/ Carcinome bronchique - EGFR » de l'APHP.

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 Bichat 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
Référent : Dr P. BEDOSSA 100, boulevard du Général Leclerc 92110 Clichy Réception : 01 40 87 54 59	Référent : Dr C.DANEL 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 \(nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr\)](mailto:nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr)
[Dr Jérôme Lamoril \(jerome.lamoril@bch.aphp.fr\)](mailto:jerome.lamoril@bch.aphp.fr)
[Pr Nadem Soufir \(nadem.soufir@bch.aphp.fr\)](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 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 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 réadressé 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. Cercler la zone d'intérêt avant envoi (IHPS annoté).

➔ Au service d'oncologie moléculaire:

- L'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.
- 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) pour les exons 18 à 21 du gène codant pour EGFR.

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Poumon / Carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC)	<i>EGFR</i> / mutations activatrices

But : Accès à une thérapie ciblée

Identifier les malades atteints de CBNPC qui pourront bénéficier d'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR (ITK-EGFR) : gefitinib (Iressa®), l'erlotinib (Tarceva®), ou l'afatinib (Giotrif®), dès la première ligne et identifier les patients qui pourront bénéficier d'une thérapie ciblée quelle que soit la ligne de traitement. Seuls les malades dont la tumeur présente une mutation activatrice de l'EGFR bénéficient du gefitinib en comparaison d'une chimiothérapie par un doublet de platine en première ligne de traitement. Ce bénéfice est encore plus grand en cas de délétion dans l'exon 19.

Indications

Analyse nécessaire : CBNPC stades IV ou IIIB non irradiables, avant traitement par un ITK-EGFR en première ligne de traitement ou avant traitement par thérapie ciblée pour les autres lignes de traitement. En priorité : 1) les adénocarcinomes en particuliers chez les non- ou ex-fumeurs, les asiatiques et les femmes ; 2) les malades avec un CBNPC non éligibles pour une chimiothérapie comportant un doublet de platine ($PS \geq 2$; comorbidités).

Analyse recommandée : CBNPC stades IV ou IIIB non irradiables, avant traitement par ITK-EGFR, quelle que soit la ligne de traitement.

Analyse exploratoire : CBNPC stades IV ou IIIB non irradiables, recherche des mutations de résistance au diagnostic et lors de la rechute à l'occasion d'une nouvelle biopsie (insertion de l'exon 20, T790M de l'exon 20).

Patients stades I, II et IIIA, notamment les tumeurs multiples.

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, cytologie...) sur lésion primitive ou métastatique.
- La référence est le prélèvement frais ou congelé rapidement qui induit le moins de résultats non-interprétables. Dans la pratique, sur prélèvement fixé en formol tamponné pendant moins de 48H.
- Contrôle histologique indispensable permettant d'indiquer le % de cellules tumorales.
- Macrodissection sur lame préférable si <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. Recherche des mutations dans les exons 19 (délétions) et 21 (mutation L858R) représentant > 85% des mutations activatrices.
2. Recherche de mutations activatrices plus rares dans les exons 18 (G719S, G719A, G719C) et 21 (L861Q).
3. Il n'y a pas d'indication avérée à la recherche des mutations des exons 20. La

mutation T790M est le plus souvent associée à une mutation activatrice et sa présence réduit l'efficacité des ITK-EGFR. Les délétions/insertions de l'exon 20 ont une signification thérapeutique incertaine.

4. Le séquençage a longtemps été considéré comme la technique de référence "gold standard", mais présente cependant plusieurs limites. En effet, le STIC ERMETIC a montré dans sa partie prospective incluant plus de 500 malades consécutifs que 25% des échantillons analysés contenaient moins de 50% de cellules tumorales, ce qui est au dessous du seuil nécessaire pour assurer la fiabilité des résultats (Eberhard 2008, Pao 2007). Le taux d'échantillons non amplifiables pour les 4 exons était de l'ordre de 10% et de 15% pour le seul exon 18, 10% pour l'exon 19, 24% pour l'exon 20, 13% pour l'exon 21. Ces constatations également faites dans la phase rétrospective étaient améliorées par la suppression des prélèvements de mauvaise qualité (ancien, fixation au Bouin). Des techniques alternatives ont été développées et plusieurs d'entre elles sont utilisées par les plateformes de génétique moléculaire : le pyroséquençage ; le HRM (high resolution melting analysis), couplé ou non au séquençage ; la discrimination allélique ; l'extension d'amorces de type Snap Shot ; l'analyse de fragments...

Délai moyen de rendu de résultat

7 à 14 jours

Informations complémentaires

La probabilité de détecter une mutation activatrice dans un CBNPC est d'autant plus probable que la tumeur est un adénocarcinome (pulmonaire périphérique : TTF1 positif) (OR=4,4) et le malade non ou ancien fumeur (OR=6,5), d'origine asiatique (OR=3,3) et de sexe féminin (OR=1,7).

Néanmoins, l'association de ces 5 facteurs ne correspond que dans 60% des cas à une tumeur présentant une mutation activatrice de l'EGFR.

Références (sur les indications et les techniques)

1. Cadranet J, Zalcman G, Sequist L.
Genetic profiling and EGFR-directed therapy: evidence in clinical implications.
Eur. Respir. J. 2011; Jan;37(1):183-93
2. Laurent-Puig P, Lièvre A, Blons H.
Mutations and response to epidermal growth factor inhibitors.
Clin Cancer Res. 2009; 15:1133.
3. Mok TS, Wu Y, Thongprasert S, Yang C, Chu D, Saijo N, et al.
Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma.
N. Engl. J. Med. 2009; 361:947.
4. Mitsudomi T, Yatabe Y.
Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer.
Cancer Sci. 2007; 98:1817.
5. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer.
Nat. Rev. Cancer. 2007; 7:169.

Auteurs

- | | |
|--|---------------|
| • Rédacteurs V1 : J. Cadranet, R. Lacave, P. Laurent-Puig | le 06/06/2014 |
| • Relecteurs : M. Antoine, D. Damotte, F Goldwasser,
C. Guettier, JF Fléjou | le 06/06/2014 |
| • Validation Comité de Coordination | le 16/06/2014 |