

Hôpital Universitaire Ambroise Paré

9 Avenue Charles de Gaulle – 92104 Boulogne Cedex

Service de Pathologie - Chef de Service : Pr J.F. Emile – Tel secrétariat : 01 49 09 57 28

**FICHE D'INFORMATION CONCERNANT LES ANALYSES EN PATHOLOGIE
MOLECULAIRE A L'HOPITAL AMBROISE PARE**

Quelles analyses :

Les analyses réalisées en routine à l'hôpital Ambroise Paré :

- **Adénocarcinomes colorectaux :** 1) instabilité des microsatellites
- **Tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) :** 2) mutations KRAS, NRAS et BRAF
- **Mélanomes :** mutations de KIT et PDGFRA
- **Histiocytoses :** mutations BRAF, NRAS et KIT
- **Sarcomes (techniques de FISH) :** mutations de BRAF, NRAS et MAP2K1
- **Tumeurs desmoïde :** amplification de MDM2, t(17,22)
- **Carcinomes pulmonaires non à petites cellules :** mutation de CTNNB1
 - Recherche des mutations KRAS et BRAF, et typage moléculaire par Séquençage Nouvelle Génération (en collaboration avec HEGP).
 - Recherche par immunohistochimie du réarrangement ALK.

Pour toute autre demande d'analyse, nous contacter au préalable.

Pour quels patients et dans quels buts :

Les indications sont détaillées dans les fiches médicales correspondantes disponibles sur le site Oncomolpath.

Sur quels prélèvements :

- Tumeur primitive ou métastatique.
- Prélèvement tissulaire fixé (préférentiellement formol tamponné) et inclus en paraffine.
- Le prélèvement doit être aussi riche que possible en cellules tumorales.

Où adresser sa demande :

Service de pathologie - Pathologie Moléculaire - Hôpital Ambroise Paré

Adresse indiquée sur le bordereau de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)

Contacts privilégiés indiqués à la fin du présent document.

Que faut-il envoyer :

Comme indiqué sur le bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>), l'échantillon à analyser doit être :

- Bloc(s) d'inclusion en paraffine* + 1 lame HES ayant servie au diagnostic notamment pour les biopsies (En cas d'échec, un bloc congelé pourra être demandé)

* Pour le statut MSI, envoyer 1 bloc comportant tissu tumoral et muqueuse normale ou 2 blocs (1 tumoral et l'autre muqueuse normale)

Pour tout autre type d'échantillon, nous contacter au préalable.

Toujours joindre à l'échantillon :

- bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)
- Une copie du compte rendu (CR) original d'anatomie pathologique qui peut dispenser de remplir certaines rubriques du bon de demande d'examen si elles sont présentes sur le CR.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement, l'un de nos objectifs qualité est de répondre à 90% des demandes dans un délais de 21 jours (maximum 28 jours selon les recommandations de l'INCa). Le résultat est adressé aux pathologistes et aux correspondants qui sont mentionnés dans le bon de transport et demande d'examen.

En cas de situation d'urgence, la mention **URGENT** doit être ajoutée sur le bon de transport et de demande d'examen pour de réduire au maximum le délai de rendu.

Quelles techniques utilisons-nous ?

Contrôle histologique :

Sur coupe 4 µm colorée à l'HES. Validation du diagnostic histologique. Evaluation du pourcentage de cellules tumorales. Sélection, si besoin, de la zone tumorale à macro-disséquer ou à prélever sélectivement sur le bloc.

Macro-dissection / prélèvement sélectif : (Pour les analyses « en tube » uniquement)

Pour tout échantillon fixé dont le pourcentage estimé de cellules tumorales est inférieur à 50% et qui peut être augmenté par macro-dissection. Dans un environnement confiné, si besoin sous contrôle à la loupe binoculaire.

Extraction de l'ADN : (Pour les analyses « en tube » uniquement)

Digestion en protéinase K sous agitation constante à 56°, puis KIT Qiagen®

Analyses « en tube »

- Mutations de *KRAS* et *BRAF* pour tumeurs colorectales : Discrimination allélique par PCR temps réel. Recherche des mutations G12S, G12R, G12C, G12D, G12A G12V et G13D de *KRAS* et V600E/K de *BRAF* uniquement. Sensibilité de 5% à 10%. En cas de négativité, analyse par séquençage sanger ciblée sur les codons 12, 13, 61, 117, 146 de *KRAS* et *NRAS*.
- Mutations de *BRAF* et *NRAS* pour tumeurs mélanocytaires et histiocytaires : Pyroséquençage ciblant les codons 600 de *BRAF* et 61 de *NRAS*, puis séquençage Sanger des codons 12 et 13 de *NRAS* si pas de mutations.
- Mutation de *MAP2K1* pour tumeurs histiocytaires : Analyse de taille des amplicons (LAPP) des exons 2 et 3, et séquençage Sanger.
- Mutations de *CTNNB1* pour tumeurs desmoïdes : Pyroséquençage ciblant les codons 41 et 45
- Mutations de *KIT* pour suspicion de GIST ou mélanome : Analyse des exons 9, 11, 13 et 17 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de *PDGFRA* pour suspicion de GIST : Analyse des exons 12, 14 et 18 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de l'*EGFR* : discrimination allélique + sonde PNA pour les substitutions L858R et T790M (sensibilité de 5%). Analyse de fragment pour les délétions de l'exon 19 et les insertions de l'exon 20 (sensibilité de 10%). En cas de négativité, séquençage pour les codons 719 à 986 (sensibilité de 30%).

En collaboration avec le service de Biochimie de l'hôpital Européen George Pompidou

- Statut MSI / Recherche d'un déficit du système de réparation des mésappariements (système MMR) : Analyse de la taille de fragment des microsatellites BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27. En collaboration avec le service de Biochimie et Génétique Moléculaire de notre pôle.

Analyses *in situ* :

- Statut MSI / Déficit en réparation de l'ADN (MMR) : Immunohistochimie avec les Anti- MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6 (clones G168-728, A16-4, FE11 et 44/MSH6) sur automate Bond-Max.
- Statut BRAF : Immunohistochimie avec l'anti-BRAF VE1 sur automate Bond-Max.
- Amplification de MDM2 : FISH
- Translocation t(17;22) dans les dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand : FISH

Contacts :

- Carcinome colorectal : Statut MSI / Recherche d'un déficit du système MMR :
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28
Courriel: catherine.julie@aphp.fr
- Carcinome colorectal : Mutations de *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- GIST : Mutations de *KIT* et *PDGFRA* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Mélanome : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *KIT* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Carcinome bronchopulmonaire : Mutations de l'*EGFR* :
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28
Courriel: catherine.julie@aphp.fr
Dr Hélène Blons service de Biochimie, HEGP, tél: 01 56 09 39 35
Courriel: helene.blons@aphp.fr
- Amplification MDM2 et translocations t(17, 22) :
Dr Cristi Marin, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 27 / 28
Dr Ute Zimmermann, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 24 / 28
Dr Z Hélias-Rodzewicz, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 56 88
Courriel: cristi.marin@aphp.fr
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr

Hôpital Universitaire Ambroise Paré

9 Avenue Charles de Gaulle – 92104 Boulogne Cedex

Service de Pathologie - Chef de Service : Pr J.F. Emile – Tel secrétariat : 01 49 09 57 28

**FICHE D'INFORMATION CONCERNANT LES ANALYSES EN PATHOLOGIE
MOLECULAIRE A L'HOPITAL AMBROISE PARE**

Quelles analyses :

Les analyses réalisées en routine à l'hôpital Ambroise Paré :

- **Adénocarcinomes colorectaux :** 1) instabilité des microsatellites
- **Tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) :** 2) mutations KRAS, NRAS et BRAF
- **Mélanomes :** mutations de KIT et PDGFRA
- **Histiocytoses :** mutations BRAF, NRAS et KIT
- **Sarcomes (techniques de FISH) :** mutations de BRAF, NRAS et MAP2K1
- **Tumeurs desmoïde :** amplification de MDM2, t(17,22)
- **Carcinomes pulmonaires non à petites cellules :** mutation de CTNNB1
 - Recherche des mutations KRAS et BRAF, et typage moléculaire par Séquençage Nouvelle Génération (en collaboration avec HEGP).
 - Recherche par immunohistochimie du réarrangement ALK.

Pour toute autre demande d'analyse, nous contacter au préalable.

Pour quels patients et dans quels buts :

Les indications sont détaillées dans les fiches médicales correspondantes disponibles sur le site Oncomolpath.

Sur quels prélèvements :

- Tumeur primitive ou métastatique.
- Prélèvement tissulaire fixé (préférentiellement formol tamponné) et inclus en paraffine.
- Le prélèvement doit être aussi riche que possible en cellules tumorales.

Où adresser sa demande :

Service de pathologie - Pathologie Moléculaire - Hôpital Ambroise Paré

Adresse indiquée sur le bordereau de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)

Contacts privilégiés indiqués à la fin du présent document.

Que faut-il envoyer :

Comme indiqué sur le bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>), l'échantillon à analyser doit être :

- Bloc(s) d'inclusion en paraffine* + 1 lame HES ayant servie au diagnostic notamment pour les biopsies (En cas d'échec, un bloc congelé pourra être demandé)

* Pour le statut MSI, envoyer 1 bloc comportant tissu tumoral et muqueuse normale ou 2 blocs (1 tumoral et l'autre muqueuse normale)

Pour tout autre type d'échantillon, nous contacter au préalable.

Toujours joindre à l'échantillon :

- bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)
- Une copie du compte rendu (CR) original d'anatomie pathologique qui peut dispenser de remplir certaines rubriques du bon de demande d'examen si elles sont présentes sur le CR.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement, l'un de nos objectifs qualité est de répondre à 90% des demandes dans un délais de 21 jours (maximum 28 jours selon les recommandations de l'INCa). Le résultat est adressé aux pathologistes et aux correspondants qui sont mentionnés dans le bon de transport et demande d'examen.

En cas de situation d'urgence, la mention **URGENT** doit être ajoutée sur le bon de transport et de demande d'examen pour de réduire au maximum le délai de rendu.

Quelles techniques utilisons-nous ?

Contrôle histologique :

Sur coupe 4 µm colorée à l'HES. Validation du diagnostic histologique. Evaluation du pourcentage de cellules tumorales. Sélection, si besoin, de la zone tumorale à macro-disséquer ou à prélever sélectivement sur le bloc.

Macro-dissection / prélèvement sélectif : (Pour les analyses « en tube » uniquement)

Pour tout échantillon fixé dont le pourcentage estimé de cellules tumorales est inférieur à 50% et qui peut être augmenté par macro-dissection. Dans un environnement confiné, si besoin sous contrôle à la loupe binoculaire.

Extraction de l'ADN : (Pour les analyses « en tube » uniquement)

Digestion en protéinase K sous agitation constante à 56°, puis KIT Qiagen®

Analyses « en tube »

- Mutations de *KRAS* et *BRAF* pour tumeurs colorectales : Discrimination allélique par PCR temps réel. Recherche des mutations G12S, G12R, G12C, G12D, G12A G12V et G13D de *KRAS* et V600E/K de *BRAF* uniquement. Sensibilité de 5% à 10%. En cas de négativité, analyse par séquençage sanger ciblée sur les codons 12, 13, 61, 117, 146 de *KRAS* et *NRAS*.
- Mutations de *BRAF* et *NRAS* pour tumeurs mélanocytaires et histiocytaires : Pyroséquençage ciblant les codons 600 de *BRAF* et 61 de *NRAS*, puis séquençage Sanger des codons 12 et 13 de *NRAS* si pas de mutations.
- Mutation de *MAP2K1* pour tumeurs histiocytaires : Analyse de taille des amplicons (LAPP) des exons 2 et 3, et séquençage Sanger.
- Mutations de *CTNNB1* pour tumeurs desmoïdes : Pyroséquençage ciblant les codons 41 et 45
- Mutations de *KIT* pour suspicion de GIST ou mélanome : Analyse des exons 9, 11, 13 et 17 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de *PDGFRA* pour suspicion de GIST : Analyse des exons 12, 14 et 18 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de l'*EGFR* : discrimination allélique + sonde PNA pour les substitutions L858R et T790M (sensibilité de 5%). Analyse de fragment pour les délétions de l'exon 19 et les insertions de l'exon 20 (sensibilité de 10%). En cas de négativité, séquençage pour les codons 719 à 986 (sensibilité de 30%).

En collaboration avec le service de Biochimie de l'hôpital Européen George Pompidou

- Statut MSI / Recherche d'un déficit du système de réparation des mésappariements (système MMR) : Analyse de la taille de fragment des microsatellites BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27. En collaboration avec le service de Biochimie et Génétique Moléculaire de notre pôle.

Analyses *in situ* :

- Statut MSI / Déficit en réparation de l'ADN (MMR) : Immunohistochimie avec les Anti- MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6 (clones G168-728, A16-4, FE11 et 44/MSH6) sur automate Bond-Max.
- Statut BRAF : Immunohistochimie avec l'anti-BRAF VE1 sur automate Bond-Max.
- Amplification de MDM2 : FISH
- Translocation t(17;22) dans les dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand : FISH

Contacts :

- Carcinome colorectal : Statut MSI / Recherche d'un déficit du système MMR :
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28
Courriel: catherine.julie@aphp.fr
- Carcinome colorectal : Mutations de *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- GIST : Mutations de *KIT* et *PDGFRA* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Mélanome : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *KIT* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr
- Carcinome bronchopulmonaire : Mutations de l'*EGFR* :
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28
Courriel: catherine.julie@aphp.fr
Dr Hélène Blons service de Biochimie, HEGP, tél: 01 56 09 39 35
Courriel: helene.blons@aphp.fr
- Amplification MDM2 et translocations t(17, 22) :
Dr Cristi Marin, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 27 / 28
Dr Ute Zimmermann, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 24 / 28
Dr Z Hélias-Rodzewicz, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 56 88
Courriel: cristi.marin@aphp.fr
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28
Courriel: jean-francois.emile@uvsq.fr

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Poumon / Carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC)	Réarrangement de ALK

But : Accès à une thérapie ciblée

Identifier les malades atteints de CBNPC qui pourraient bénéficier d'un traitement par le crizotinib (Xalkori®) dans le cadre de l'AMM en deuxième ligne de traitement des CBNPC métastatiques ALK positifs, obtenue à la suite des données publiées ou rapportées des essais PROFILE 1001, 1005, 1007. Les résultats positifs de l'essai PROFILE 1014 permettront probablement une extension de l'AMM pour ces malades dès la première ligne de traitement. Dans tous ces essais, le critère d'inclusion repose sur l'identification à partir d'une biopsie ou d'une cytologie (la seule réserve est la nécessité d'avoir au moins 50 cellules tumorales analysables) de la présence dans la tumeur d'un réarrangement du gène ALK, mis en évidence par une technique de FISH utilisant des sondes dites « break appart ». Par ailleurs, le crizotinib pourrait être actif sur des tumeurs présentant des réarrangements impliquant d'autres gènes.

Indications

Analyse nécessaire : Adénocarcinomes de stades IV ou IIIB non irradiables, avant traitement par crizotinib dans le cadre de l'AMM.

En priorité :

1. dans les sous types cribriforme, en bagues à chaton ou mucineux ;
2. pour les tumeurs ne présentant pas de mutation de l'EGFR ou de KRAS ;
3. les malades non- ou ex-fumeurs ;
4. les malades ayant résisté à un ITK-EGFR.

Analyse recommandée : CBNPC quelque soit le type histologique de stades IV ou IIIB non irradiables, avant traitement par crizotinib.

Analyse exploratoire : tout adénocarcinome, uniquement dans les centres de référence.

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 fixé rapidement qui induit le moins de résultats non-interprétables. Dans la pratique, sur prélèvement fixé en formol tamponné pendant moins de 48H.
- Absence de colorant (type éosine sauf si très dilué et validé) dans les différentes étapes de la prise en charge anatomopathologique.
- Contrôle histologique indispensable permettant d'indiquer le type histologique.

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. La seule technique validée à ce jour est la recherche de réarrangement ALK par technique FISH.
2. La technique FISH la plus répandue est celle utilisant une sonde « break appart » qui analyse uniquement le locus ALK et pas le partenaire.
3. Il existe différentes sondes commercialisées, aucune n'est clairement désignée comme de référence.
4. L'utilisation d'une technique d'immunohistochimie validée au niveau de la plateforme (selon le référentiel de l'INCa) avec l'anticorps anti-ALK (clone 5A4) pour un test de présélection des réarrangements ALK.

Délai moyen de rendu de résultat

7 jours

Informations complémentaires

Références (sur les indications et les techniques)

1. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 1693–1703.
2. Crinò L, Kim D, Riely GJ, *et al.* Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. *J Clin Oncol* 2011; 29: abstr 7514.
3. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 2385–2394.
4. Mok T, Kim DW, Wu YL, *et al.* First-line crizotinib versus pemetrexed–cisplatin or pemetrexed–carboplatin in patients (pts) with advanced ALK-positive non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a phase III study (PROFILE 1014). *ASCO Annual Meeting 2014; abstr 8002.*
5. EMA. Pfizer Limited. Xalkori 200 mg hard capsules: EU summary of product characteristics. 2012. http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002489/WC500134759.pdf Last accessed: May 1 2014.

Auteurs

- | | |
|---|---------------|
| • Rédacteurs V1 : J. Cadranel, D. Damotte | le 16/06/2014 |
| • Relecteurs : T.Molina, M. Antoine | le 23/06/2014 |
| • Validation Comité de Coordination | le 23/06/2014 |