

## BON DE TRANSPORT ET DE DEMANDE D'EXAMEN DE PATHOLOGIE MOLECULAIRE

### 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**

### PATIENT

Nom d'usage :

Nom de naissance :

Prénom :

Date de naissance :

Sexe : ☐ Féminin ☐ Masculin

### EXPEDITEUR / CORRESPONDANTS

**Pathologiste** (Nom, prénom, adresse, email, téléphone) :

**Clinicien référent** (Nom, prénom, adresse, email, téléphone) :

### MATERIEL TRANSMIS

Référence dans le labo d'origine :

Localisation primitive :

Nature de l'échantillon :

☐ Bloc(s) paraffine (**recommandé**)

Nombre :

☐ Bloc congelé

☐ Autre (Préciser) :

☐ Tumeur primitive

☐ Métastase

☐ Tissu non tumoral

Prélèvement :

☐ Pièce opératoire

☐ Biopsie

☐ Cytologie

### ANALYSE DEMANDEE

☐ KRAS / NRAS

☐ KIT

☐ MSI

☐ BRAF

☐ PDGFRA

☐ MDM2 (FISH)

☐ NRAS

☐ EGFR

☐ Darier-Farrand (FISH)

☐ CTNNB1

### TRANSPORTEUR

Date de départ :

Température de transport :

☐ Poste. Préciser le type d'envoi :

☐ Température ambiante

☐ Autre. Préciser :

☐ Dans la glace

☐ Carboglace

### RECEPTION

**Date de réception** :

☐ Conforme aux indications de l'expéditeur

☐ Non conforme aux indications de l'expéditeur. Préciser :

Visa :

**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
  - 2) mutations *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*
- **Tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) :** mutations de *KIT* et *PDGFRA*
- **Mélanomes :** mutations *BRAF*, *NRAS* et *KIT*
- **Histiocytoses :** mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1*
- **Sarcomes (techniques de FISH) :** amplification de *MDM2*, t(17,22)
- **Tumeurs desmoïde :** mutation de *CTNNB1*
- **Carcinomes pulmonaires non à petites cellules :**
  - 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  $\mu$ m 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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto: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](mailto:catherine.julie@aphp.fr)  
Dr Hélène Blons service de Biochimie, HEGP, tél: 01 56 09 39 35  
Courriel: [helene.blons@aphp.fr](mailto: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](mailto: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](mailto:jean-francois.emile@uvsq.fr)

## 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<sup>ère</sup> ligne) et BRIM2 (2<sup>ème</sup> 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 |