

## 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 : <input type="checkbox"/> Féminin <input type="checkbox"/> Masculin |                     |

### EXPEDITEUR / CORRESPONDANTS

|  |   |
|--|---|
| <b>Pathogiste</b> (Nom, prénom, adresse, email, téléphone) : | <b>Clinicien référent</b> (Nom, prénom, adresse, email, téléphone): |
|--|---|

### MATERIEL TRANSMIS

|  |   |
|--|---|
| <u>Référence dans le labo d'origine</u> :<br><br><u>Nature de l'échantillon</u> :<br><input type="checkbox"/> Bloc(s) paraffine (recommandé)<br>Nombre :<br><input type="checkbox"/> Bloc congelé<br><input type="checkbox"/> Autre (Préciser) : | <u>Localisation primitive</u> :<br><input type="checkbox"/> Tumeur primitive <input type="checkbox"/> Métastase<br><input type="checkbox"/> Tissu non tumoral<br><br><u>Prélèvement</u> :<br><input type="checkbox"/> Pièce opératoire <input type="checkbox"/> Biopsie<br><input type="checkbox"/> Cytologie |
|--|---|

### ANALYSE DEMANDEE

|                                      |                                 |  |
|--------------------------------------|---------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> KRAS / NRAS | <input type="checkbox"/> KIT    | <input type="checkbox"/> MSI                   |
| <input type="checkbox"/> BRAF        | <input type="checkbox"/> PDGFRA | <input type="checkbox"/> MDM2 (FISH)           |
| <input type="checkbox"/> NRAS        | <input type="checkbox"/> EGFR   | <input type="checkbox"/> Darier-Farrand (FISH) |
| <input type="checkbox"/> CTNNB1      |                                 |  |

### TRANPORTEUR

|  |   |
|--|---|
| Date de départ :   | Température de transport :  |
| <input type="checkbox"/> Poste. Préciser le type d'envoi : | <input type="checkbox"/> Température ambiante                                 |
| <input type="checkbox"/> Autre. Préciser :                 | <input type="checkbox"/> Dans la glace<br><input type="checkbox"/> Carboglace |

### RECEPTION

|   |  |
|---|--|
| <b>Date de réception :</b>  |  |
| <input type="checkbox"/> Conforme aux indications de l'expéditeur                 |  |
| <input type="checkbox"/> 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
- **Tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) :** 2) mutations *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* 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 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](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**

| <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 |