

Laboratoire de Biochimie (Service du Pr. BEAUNE)
UF Pharmacogénétique et Oncologie Moléculaire
Contacts : Dr Hélène Blons, Dr Céline Narjoz
Tél. : 01 56 09 3935/2435/3882 Fax : 3393

Laboratoire d'Anatomopathologie
(Service du Pr. BRUNEVAL)
Contacts : Dr Laure Gibault
Tél. : 01 56 09 2336/3886 Fax : 3889

Patient	Nom : _____		Prénom : _____
Né(e) : _____	Date de naissance : _____ / _____ / _____		Sexe : M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>

Pathologiste demandeur	Clinicien référent
Date de la demande : _____	Contexte de la demande : _____
Nom, adresse : _____	Nom, adresse : _____

Matériel transmis (Prélèvement fixé de préférence dans du formol moins de 48 heures)
Date prélèvement : _____ URGENT

Délai prélèvement/fixation : _____ Fixateur : _____ Durée fixation : _____

Diagnostic anatomopathologique (double du CR) : _____

Référence laboratoire : _____ Nature: copeaux lames Blocs

% de cellules tumorales dans la zone sélectionnée : _____

Tumeur primitive : Poumon Colon Mélanome Ovaire Autres tumeurs :

Gènes à analyser:	Date réception plateforme :	
<input type="checkbox"/> Typage colon (KRAS, BRAF, NRAS)	<input type="checkbox"/>	Bétacaténine
<input type="checkbox"/> Typage poumon (EGFR, KRAS, BRAF, HER2)	<input type="checkbox"/>	Autre typage : _____
<input type="checkbox"/> Typage mélanome (BRAF, NRAS)	<input type="checkbox"/>	Exome/RNAseq : _____
<input type="checkbox"/> Phénotype RER (MSI)	<input type="checkbox"/>	Protocole (joindre demande spécifique) : _____

Estimation du % de cellules tumorales (réservé au Service de Pathologie de la plateforme)

Date de réception : _____ / _____ / _____

Date de coupe : _____ / _____ / _____

Prélèvement conforme: OUI NON | Technicien : _____

N°
d'examen
en T

Copeaux ou Macro-dissection

IHC MSI IHC Alk5A4 +3 LB
LB , nombre : _____

% de cellules tumorales : <10% 10-20% 20-50% >50%

Commentaires : _____

Pathologiste : _____

Date : _____ / _____ / _____

Code ADICAP : _____ / _____ / 0181

Rédaction		Validation		Approbation
Nom, fonction	Date	Nom, fonction	Date	
HELENE BLONS Maître de conférences à l'université praticien hospitalier 17/07/2013 SOPHIE MAILLARD Technicien d'analyse en biologie médicale 19/06/2013	19/06/2013	PATRICK BRUNEVAL Médecin professeur d'université - praticien hospitalier 09/08/2013	09/08/2013	

1- Références et documents

Guide « Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides »

<http://www.e-cancer.fr/soins/les-traitements/lacces-aux-therapies-ciblees/les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers>

Site web de la plateforme INCA APHP « Oncomolpath ». Sont disponibles des fiches médicales consultables par gènes, sites ou organes

<http://portail-web.aphp.fr/zoncomolpath/public/index/recherche/type/F>

2- Le prélèvement

2.1 Type de prélèvement

La recherche de mutations somatiques peut être effectuée sur tout prélèvement contenant des cellules tumorales : pièce opératoire, biopsies ou cytologie.

Le prélèvement peut être obtenu au moment du diagnostic initial ou à distance sur la tumeur primitive ou une métastase.

2.2 Fixation du prélèvement

La méthode de fixation influe sur la qualité de l'ADN obtenu. La fixation en formol tamponné suivie d'une inclusion en paraffine doit être privilégiée.

La durée de fixation doit être, dans la mesure du possible,

- Pour les biopsies : inférieure à 48 heures.
- Pour les pièces opératoires : supérieure à 24 heures et de préférence inférieure à 96 heures

Les autres fixateurs (liquide de Bouin et autres fixateurs contenant de l'acide picrique, fixateurs contenant des dérivés mercuriels) peuvent interférer avec les analyses de biologie moléculaire et ne sont pas recommandés.

Les fixateurs à base d'alcool ou les substituts de formol (type Excell Plus, FineFix ou RCL2) et l'AFA (alcool/formol/acide acétique) ne peuvent être considérés comme des standards.

2.3 Matériel utilisé

Un bloc suffisamment riche en matériel tumoral doit être sélectionné.

Envoi de blocs tumoraux : Le pathologiste responsable du diagnostic de cancer sélectionne les blocs et les envoie à la plateforme. La préparation et la qualification des échantillons sont alors réalisées par un pathologiste de la plateforme.

 Hôpitaux Universitaires Paris Ouest Centre-Coton Hôpital européen Georges-Pompidou Vaugirard - Gabarre-Pellegrin	Fiche	MODALITES PRE-ANALYTIQUES POUR LES ECHANTILLONS TUMORAUX DEVANT FAIRE L'OBJET D'UNE ANALYSE MOLECULAIRE		
		Réf. : ANAP/FI/010/V1	Date d'application : 09/08/2013	Page : 2/2

Envoi de copeaux tumoraux (3-5 copeaux de 10 µm à 20 µm) : Le pourcentage de cellules tumorales sera indiqué sur la feuille de demande. Il est rappelé que lorsque ce pourcentage est inférieur à 20%, un envoi de 5 lames blanches 5 µm avec zone tumorale cerclée est préférable à l'envoi des copeaux.

Envoi d'ADN extraits : Le pourcentage de cellules tumorales correspondant au bloc ayant servi pour l'extraction sera indiqué sur la feuille de demande.

Pour ces deux cas de figure : le pathologiste responsable du diagnostic de cancer souhaite prélever, qualifier et/ou préparer lui-même les échantillons. Une collaboration et formalisée par une convention. Le pathologiste ou biologiste moléculaire de la plateforme s'assure que le pathologiste responsable du diagnostic de cancer est formé aux conditions d'assurance-qualité et qu'il s'engage à les respecter par la suite.

3- Réalisation

Afin d'éviter les contaminations par des micro-fragments tissulaires il est recommandé d'utiliser un poste de travail dédié pour la préparation des échantillons.

Les extractions d'ADN doivent être réalisées avec un matériel dédié, dans une zone dédiée.

Le pourcentage de cellules tumorales sera établi comme indiqué dans le guide « Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides »
<http://www.e-cancer.fr/soins/les-traitements/lacces-aux-therapies-ciblees/les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers>

Le prélèvement est envoyé accompagné des données mentionnées dans le contrat de sous-traitance. La feuille de demande peut être téléchargée depuis le site ONCOMOLPATH

4- Annexe

Des informations pratiques pourront être consultées sur les sites de l'INCA et ONCOMOLPATH

<http://www.e-cancer.fr/soins/les-traitements/lacces-aux-therapies-ciblees/les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers>

<http://portail-web.aphp.fr/zoncomolpath/public/index/recherche/type/F>

Pour toute question vous pouvez joindre la plateforme de l'HEGP

Pathologie

Dr Laure Gibault : 01 56 09 23 36
 Dr Sophie Camilleri : 01 56 09 38 93
 Dr Tchao Méatchi : 01 56 09 39 09
 Sec : 01 56 09 38 86 / 87 / 88

Biologie Moléculaire

Dr H BLONS : 0156093935/5686
 Dr C NARJOZ : 0156092435
 Secrétariat : 0156093882

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
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 |