

GROUPE HOSPITALIER AVICENNE – JEAN VERDIER – RENE MURET

Contacts :

Pr O. SCHISCHMANOFF, service de BIOCHIMIE, Hôpital Avicenne, 125 rue de Stalingrad, 93009 BOBIGNY – T : 01 48 95 56 24 / F : 01 48 95 56 27
Dr C. LAGORCE, service de PATHOLOGIE, Hôpital Avicenne, 125 rue de Stalingrad, 93009 BOBIGNY – T : 01 48 95 60 7 / F : 01 48 95 56 02

BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE

PATIENT	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
Nom :	Née :	
Prénom :	Date de naissance :	

PATHOLOGISTE DEMANDEUR

NOM :

ADRESSE :

EXAMEN DEMANDE :

CONTEXTE DE LA DEMANDE :

DATE DE LA DEMANDE :

MATERIEL TRANSMIS

FIXATEUR UTILISE :** **DUREE DE FIXATION :**

Diagnostic anatomo-pathologique : (ou double compte-rendu)

Référence Laboratoire : Date du prélèvement :

Nature (coupes, blocs, lames....) :

** PAS DE BOUIN

PRECISER DANS LA ZONE SELECTIONNEE POUR ANALYSE

% de noyaux de cellules tumorales :

% de noyaux de cellules non tumorales :

% superficie de plages acellulaires colloïde : nécrose : fibrose :

Pathologiste validant l'analyse morphologique :

CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises)

Nom :

Adresse :

RECOMMANDATIONS DE TRANSPORT ET DELAI DE RENDU DE RESULTAT

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

HOPITAL AVICENNE

135, ROUTE DE STALINGRAD, 93009 BOBIGNY CEDEX
STANDARD : 01 48 95 55 55 INTERNATIONAL : 33 1 48 95 55 55

SERVICE DE BIOCHIMIE (Pr N.) - CONTACT : Pr O. SCHISCHMANOFF - TEL SECRETARIAT : 01 48 95 50 21/FAX : 01 48 95 56 27

SERVICE DE PATHOLOGIE (Pr A. MARTIN) - CONTACT : Dr C. LAGORCE - TEL SECRETARIAT : 01 48 95 56 01/FAX: 01 48 95 56 02

Informations pratiques concernant les recherches : statut mutationnel de KRAS, BRAF et statut MSI dans les cancers du colon à l'hôpital Avicenne

Pour quels patients :

Patients atteints de cancer colorectal métastatique (1).

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Colon/ Adénocarcinome - K-RAS/ mutations » de l'AP-HP.

Patients nécessitant une détermination du statut MSI/BRAF dans le cadre d'une consultation d'oncogénétique (2).

Dans quels buts :

(1) Définir l'éligibilité à un traitement ciblé anti-EGFR par Cetuximab ou Panitumumab. La présence de mutations sur les codons 12 et 13 est prédictive d'une absence de réponse au traitement.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Colon/ Adénocarcinome - K-RAS/ mutations» de l'AP-HP.

(2) Identifier un éventuel syndrome HNPCC

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). Si nécessaire, la cellularité tumorale du prélèvement sera estimée par le pathologiste de la plateforme, elle peut néanmoins être précisée sur la fiche de prescription si elle est connue du prescripteur.

Où adresser sa demande :

Votre demande sera traitée à l'hôpital Avicenne.

➔ Le prélèvement sera réceptionné par le service de biochimie et biologie moléculaire.

Référent : Pr O. SCHISCHMANOFF

laboratoire : Biochimie et biologie moléculaire, *Unité d'oncologie moléculaire*

Hôpital Avicenne

135 route de Stalingrad, 93009 Bobigny cedex

Réception : 01 48 95 50 21 poste 66 24

Qui transmet, le cas échéant, à son correspondant pathologiste.

Référent : Dr C. LAGORCE (56 07) christine.lagorce@avc.aphp.fr
Secrétariat : 01 48 95 56 01

Si nécessaire, le pathologiste de la plate-forme sélectionne le bloc tumoral et détermine le pourcentage de cellules tumorales sur la coupe correspondante colorée par l'HES. Des coupes épaisses ou des copeaux sont préparés et transmis à l'unité d'oncologie moléculaire qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation.

Les résultats seront transmis au prescripteur, ils peuvent être obtenus en contactant la plateforme :

référent : Pr O. SCHISCHMANOFF (01 48 95 56 24) olivier.schischmanoff@avc.aphp.fr

Que faut-il envoyer :

- Tumeur primitive ou localisation métastatique fixée (préférentiellement formol, le liquide de Bouin est formellement exclu) et incluse en paraffine.

➔ Préférentiellement, au laboratoire de biochimie et biologie moléculaire :

- **Plusieurs copeaux** d'un fragment tumoral fixé en formol neutre et inclus en paraffine, placés dans un microtube tube conique de 1,5 mL et *DNAse-free*.
- Ou : 4 coupes épaisses ($\geq 7 \mu\text{m}$) d'un fragment tumoral fixé en formol neutre et inclus en paraffine et 1 coupe contiguë colorée (HES) avec indication claire de la zone tumorale.

N.B. : **Le prélèvement doit comporter plus de 30% de cellules tumorales.**

➔ A défaut, au laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques :

- le bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales (par rapport aux cellules totales de l'échantillon).

➔ Dans tous les cas :

- le compte rendu d'anatomo-pathologie 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,
- 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, un **délai moyen de 15 jours** (maximum 21 jours) est à prévoir. Le résultat est adressé aux correspondants qui seront mentionnés dans le Bon de demande d'examen. Le résultat est co-signé par les référents anatomo pathologistes et 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 ré-adressé en même temps que le résultat.

Quelles techniques utilisons-nous ?

➔ à l'unité d'oncologie moléculaire :

- l'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.

KRAS : **discrimination allélique** à l'aide de 7 sondes couvrant les 7 mutations à rechercher (G12S, G12R, G12C, G12D, G12A G12V et G13D) Taqman 7000 ou 7500 (Applied). Cette technique est sensible (5%) mais ne détecte que les mutations citées ci-dessus.

BRAF : discrimination allélique à l'aide d'une sonde permettant l'identification de la mutation **V600E**. Cette technique est sensible (5%).

Statut MSI : Analyse de fragment à l'aide des marqueurs microsatellites validés BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR27.

Ces analyses sont effectuées en duplicate.

➔ 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).

-5 coupes de 10µm seront réalisées et transmises au laboratoire d'oncologie moléculaire

Statut MSI : IHC hMLH1, hMSH2 et hMSH6. Cette technique est réalisée à la demande du prescripteur, et après mise en évidence d'une instabilité microsatellitaire (MSI) par biologie moléculaire.

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 |