

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 56 07 / F : 01 48 95 56 02

BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE

PATIENT

☐ Monsieur

☐ 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 : DR E. FABRE - TEL SECRETARIAT : 01 48 95 50 21/FAX : 01 48 95 56 27

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

Informations pratiques concernant la recherche du statut mutationnel de l'EGFR dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules

Pour quels patients :

Patients atteints de carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC) stade IV ou IIIB non irradiables.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale «Poumon/CBNPC - EGFR/mutations activatrices» de l'AP-HP.

Dans quels buts :

Définir l'éligibilité des patients atteints d'un CBNPC (stades IIIB ou IV) à un traitement ciblé de première ligne par inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR [gefitinib (Iressa®)].

La présence de mutations activatrices de l'EGFR est prédictive d'une réponse à ces traitements. Les délétions de l'exon 19 et la mutation L858R de l'exon 21 représentent plus de 85% des mutations activatrices du gène EGFR.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale «Poumon/CBNPC - EGFR/mutations activatrices» de l'AP-HP.

Sur quels prélèvements :

Tumeur primitive ou localisation métastatique fixée (préférentiellement formol, le liquide de Bouin est formellement exclu) et incluse en paraffine (cf. ci-dessous «que faut-il envoyer »).

Le prélèvement doit comporter **plus de 20% de cellules tumorales**. La cellularité tumorale peut être précisée sur la fiche de prescription si elle est connue du prescripteur. Le cas échéant, elle sera estimée par le pathologiste de la plateforme.

Que faut-il envoyer :

➔ 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 cône 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 20% 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.

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 : Dr E. Fabre

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 6624**

Qui transmet à son correspondant pathologiste.

Référent : Pr A. Martin (56 07), antoine.martin@avc.aphp.fr

Secrétariat : 01 48 95 56 01

Si nécessaire, le pathologiste de la plateforme 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 :

Contact : Dr E. Fabre (01 48 95 56 26), emmanuelle.fabre@avc.aphp.fr

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement, un **délai moyen de 10 jours** (maximum 15 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 ?

➔ au service d'anatomie pathologique :

- le bloc tumoral est coupé et analysé en HES pour sélection de la zone la plus richement tumorale (la richesse tumorale pourra être augmentée par macrodissection).
- 4 coupes de 10µm ou des copeaux sont réalisés et transmis au laboratoire d'oncologie moléculaire.

➔ à l'unité d'oncologie moléculaire :

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

L858R de l'exon 21 du gène EGFR : discrimination allélique (effectuée en duplicate) à l'aide d'une sonde TAQMAN-MGB spécifique de cette mutation. Taqman 7500 (Applied Biosystems). Cette technique est sensible (10%) mais ne détecte que la mutation L858R.

Délétion de l'exon 19 du gène EGFR : Analyse de fragment. ABI PRISM 3100- AVANT (Applied Biosystems).

Ces analyses sont effectuées systématiquement en duplicate.

FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Poumon / Carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC)	<i>EGFR</i> / mutations activatrices

But : Accès à une thérapie ciblée

Identifier les malades atteints de CBNPC qui pourront bénéficier d'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR (ITK-EGFR) : gefitinib (Iressa®), l'erlotinib (Tarceva®), ou l'afatinib (Giotrif®), dès la première ligne et identifier les patients qui pourront bénéficier d'une thérapie ciblée quelle que soit la ligne de traitement. Seuls les malades dont la tumeur présente une mutation activatrice de l'EGFR bénéficient du gefitinib en comparaison d'une chimiothérapie par un doublet de platine en première ligne de traitement. Ce bénéfice est encore plus grand en cas de délétion dans l'exon 19.

Indications

Analyse nécessaire : CBNPC stades IV ou IIIB non irradiables, avant traitement par un ITK-EGFR en première ligne de traitement ou avant traitement par thérapie ciblée pour les autres lignes de traitement. En priorité : 1) les adénocarcinomes en particuliers chez les non- ou ex-fumeurs, les asiatiques et les femmes ; 2) les malades avec un CBNPC non éligibles pour une chimiothérapie comportant un doublet de platine ($PS \geq 2$; comorbidités).

Analyse recommandée : CBNPC stades IV ou IIIB non irradiables, avant traitement par ITK-EGFR, quelle que soit la ligne de traitement.

Analyse exploratoire : CBNPC stades IV ou IIIB non irradiables, recherche des mutations de résistance au diagnostic et lors de la rechute à l'occasion d'une nouvelle biopsie (insertion de l'exon 20, T790M de l'exon 20).

Patients stades I, II et IIIA, notamment les tumeurs multiples.

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 frais ou congelé rapidement qui induit le moins de résultats non-interprétables. Dans la pratique, sur prélèvement fixé en formol tamponné pendant moins de 48H.
- Contrôle histologique indispensable permettant d'indiquer le % de cellules tumorales.
- Macrodissection sur lame préférable si <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. Recherche des mutations dans les exons 19 (délétions) et 21 (mutation L858R) représentant > 85% des mutations activatrices.
2. Recherche de mutations activatrices plus rares dans les exons 18 (G719S, G719A, G719C) et 21 (L861Q).
3. Il n'y a pas d'indication avérée à la recherche des mutations des exons 20. La

mutation T790M est le plus souvent associée à une mutation activatrice et sa présence réduit l'efficacité des ITK-EGFR. Les délétions/insertions de l'exon 20 ont une signification thérapeutique incertaine.

4. Le séquençage a longtemps été considéré comme la technique de référence "gold standard", mais présente cependant plusieurs limites. En effet, le STIC ERMETIC a montré dans sa partie prospective incluant plus de 500 malades consécutifs que 25% des échantillons analysés contenaient moins de 50% de cellules tumorales, ce qui est au dessous du seuil nécessaire pour assurer la fiabilité des résultats (Eberhard 2008, Pao 2007). Le taux d'échantillons non amplifiables pour les 4 exons était de l'ordre de 10% et de 15% pour le seul exon 18, 10% pour l'exon 19, 24% pour l'exon 20, 13% pour l'exon 21. Ces constatations également faites dans la phase rétrospective étaient améliorées par la suppression des prélèvements de mauvaise qualité (ancien, fixation au Bouin). Des techniques alternatives ont été développées et plusieurs d'entre elles sont utilisées par les plateformes de génétique moléculaire : le pyroséquençage ; le HRM (high resolution melting analysis), couplé ou non au séquençage ; la discrimination allélique ; l'extension d'amorces de type Snap Shot ; l'analyse de fragments...

Délai moyen de rendu de résultat

7 à 14 jours

Informations complémentaires

La probabilité de détecter une mutation activatrice dans un CBNPC est d'autant plus probable que la tumeur est un adénocarcinome (pulmonaire périphérique : TTF1 positif) (OR=4,4) et le malade non ou ancien fumeur (OR=6,5), d'origine asiatique (OR=3,3) et de sexe féminin (OR=1,7).

Néanmoins, l'association de ces 5 facteurs ne correspond que dans 60% des cas à une tumeur présentant une mutation activatrice de l'EGFR.

Références (sur les indications et les techniques)

1. Cadranet J, Zalcman G, Sequist L.
Genetic profiling and EGFR-directed therapy: evidence in clinical implications.
Eur. Respir. J. 2011; Jan;37(1):183-93
2. Laurent-Puig P, Lièvre A, Blons H.
Mutations and response to epidermal growth factor inhibitors.
Clin Cancer Res. 2009; 15:1133.
3. Mok TS, Wu Y, Thongprasert S, Yang C, Chu D, Saijo N, et al.
Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma.
N. Engl. J. Med. 2009; 361:947.
4. Mitsudomi T, Yatabe Y.
Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer.
Cancer Sci. 2007; 98:1817.
5. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer.
Nat. Rev. Cancer. 2007; 7:169.

Auteurs

- | | |
|--|---------------|
| • Rédacteurs V1 : J. Cadranet, R. Lacave, P. Laurent-Puig | le 06/06/2014 |
| • Relecteurs : M. Antoine, D. Damotte, F Goldwasser,
C. Guettier, JF Fléjou | le 06/06/2014 |
| • Validation Comité de Coordination | le 16/06/2014 |