

**GROUPE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
ALBERT CHENEVIER - HENRI MONDOR**

51 AVENUE DU MARECHAL DE LATTRE DE TASSIGNY - 94010 CRETTEIL Cedex

Contact : DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE, tel secrétariat : 01 49 81 27 28
Pr Karen LEROY (Oncologie Moléculaire), Dr Marie-Luce AURIAULT (Pathologie Digestive)

BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE :

PATIENT (ou étiquette à coller)	<input type="checkbox"/> Monsieur	<input type="checkbox"/> Madame
Nom :	Née :	
Prénom :	Date de naissance :	

PATHOLOGISTE DEMANDEUR

NOM :
ADRESSE:.....

EXAMEN DEMANDE : **RECHERCHE DE MUTATION DU GENE KRAS (adénocarcinome du colon)**

MOTIF DE LA DEMANDE : Stratégie / Adaptation thérapeutique (patient métastatique) Dépistage
 Autre :

DATE DE LA DEMANDE :

MATERIEL TRANSMIS : DOUBLE DU COMPTE-RENDU ET LAME HES A JOINDRE A LA DEMANDE

FIXATEUR UTILISE* : Formol Formol neutre DFA Autres (préciser): * PAS DE BOUIN
Type de prélèvement : Cytologie Biopsie Pièce opératoire
Site du prélèvement (organe) : Diagnostic histologique :
Référence Laboratoire : Date du prélèvement :
Nature (coupes, blocs, lames....) :

PRECISER DANS LA ZONE SELECTIONNEE POUR ANALYSE (prélèvement le plus tumoral possible)

% de noyaux de cellules tumorales :
Commentaire (nécrose, fibrose, substance colloïde....) :

CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises) : ORDONNANCE A JOINDRE

Nom :
Adresse :

RECOMMANDATIONS DE TRANSPORT ET DELAI DE RENDU DE RESULTAT :

Voir fiche pratique

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

HOPITAL HENRI MONDOR
51, AVENUE DU MARECHAL DE LATTRE DE TASSIGNY, 94010 CRETEIL CEDEX

DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE (Pr ES ZAFRANI)

CONTACTS : Pr Karen LEROY (oncologie moléculaire), Dr Marie-Luce AURIAULT (pathologie digestive)

TEL SECRETARIAT : 01 49 81 27 28 / Fax : 01 49 81 27 33

Informations pratiques concernant la recherche du statut mutationnel de KRAS dans les adénocarcinomes du colon

Pour quels patients :

Patients atteints de cancer colorectal métastatique.

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

Dans quels buts :

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 non réponse au traitement.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Colon / Adénocarcinome - K-RAS/mutations » 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.

Le prélèvement doit comporter **plus de 30% (idéalement plus de 50%) de cellules tumorales** (par rapport au nombre total de cellules) **dans la zone analysée** (éventuellement après macrodissection). Cette évaluation peut être faite par le médecin anatomo-pathologiste demandeur et précisé sur le bon de demande. A défaut, cette évaluation sera faite par le Dr Marie-Luce Auriault ou son remplaçant.

Que faut-il envoyer :

- le **bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales** (par rapport aux cellules totales de l'échantillon) **avec 1 lame HES correspondante**
- le **compte rendu d'examen** anatomo-pathologique correspondant au prélèvement
- le bon de demande d'examen (téléchargeable sur le site) dûment rempli, comportant notamment les **coordonnées complètes du clinicien demandeur** pour une transmission optimale des résultats.
- la fiche de dédommagement pour désarchivage, le cas échéant.

Où adresser sa demande (courrier médical urgent mentionné sur l'enveloppe)

Référent : Pr Karen Leroy

Laboratoire : Hôpital Henri Mondor,
Département de Pathologie (RDC haut)
51 av du Mal de Lattre de Tassigny
94010 CRETEIL Cedex

Réception : 01 49 81 27 28 ou 27 32

- ➔ Le prélèvement sera enregistré dans le logiciel de gestion du laboratoire par le secrétariat.
- ➔ Le prélèvement reçu et les documents associés sont validés pour l'analyse moléculaire par le Dr Marie-Luce Auriault (marie-luce.auriault@hmn.aphp.fr) ou son remplaçant
- ➔ Les coupes de tissus, après macrodissection éventuelle, sont préparées pour l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation, dans le secteur de Biologie Moléculaire du Département de pathologie, sous la responsabilité du Pr Karen Leroy (karen.leroy@hmn.aphp.fr)

Quelles techniques d'analyse utilisons-nous ?

- ➔ - Après analyse de la lame HES pour sélectionner une zone suffisamment tumorale, le bloc tumoral est coupé (avec ou sans macro-dissection) sur un microtome
- 5 à 10 coupes de 10µm sont réalisées et transférées dans un tube identifié.
- ➔ - l'extraction de l'ADN est réalisée à partir des coupes tissulaires à l'aide d'un robot (EZ1, QIAgen) avec des barettes de réactifs prêtées à l'emploi, selon un protocole standardisé. L'ADN est ensuite dosé en spectrophotométrie.
- ➔ - la recherche de mutations KRAS en faite en duplicate, en **discrimination allélique** à l'aide de 7 sondes couvrant les 7 mutations à rechercher (G12S, G12R, G12C, G12D, G12A, G12V et G13D) sur un appareil HT7900 (Applied Biosystems). Cette technique est sensible (elle permet de détecter la présence de 5 à 10% d'allèles mutés) mais elle ne détecte que les mutations recherchées (citées ci-dessus).

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement en anatomie pathologique, un délai maximum de **15 jours** est à prévoir. **Le résultat est adressé aux correspondants cliniciens dont les coordonnées sont précisées 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 réadressé avec le résultat, sauf mention contraire (analyses complémentaires en cours).

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 |