
	Formulaire	EXAMEN D'ONCOLOGIE MOLECULAIRE			PLATFORME ONCOMOLPATH
	Réf. : ANAP/FO/008/V5	Date d'application : 28/07/2014	Page : 1/1		
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 <input type="checkbox"/>	
Délai prélèvement/fixation :	Fixateur :	Durée fixation :
Diagnostic anatomopathologique (double du CR) :		
Référence laboratoire :	Nature: copeaux <input type="checkbox"/> lames <input type="checkbox"/> Blocs <input type="checkbox"/>	
% 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 : ____/____/____	Prélèvement conforme: OUI <input type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> N° d'examen en T </div>	
Date de coupe : ____/____/____	Technicien : _____		
Copeaux <input type="checkbox"/> ou Macro-dissection <input type="checkbox"/>			
IHC MSI <input type="checkbox"/> IHC Alk5A4 +3 LB <input type="checkbox"/>			
LB <input type="checkbox"/> , nombre : _____			
% de cellules tumorales : <10% <input type="checkbox"/> 10-20% <input type="checkbox"/> 20-50% <input type="checkbox"/> >50% <input type="checkbox"/>			
Commentaires : _____			
Pathologiste : _____		Date : ____/____/____	Code ADICAP : ____/____/ 0181

	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 : 1/2	

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/laces-aux-therapies-ciblees/les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers>

Site web de la plateforme INCA APHP « Oncomolpath ». Sont disponible 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.

	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 est 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/laces-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/laces-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
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 |