

GROUPE HOSPITALIER SAINT- LOUIS – LARIBOISIERE – F. WIDAL

Contacts :

Dr V. MEIGNIN, SERVICE DE PATHOLOGIE Hôpital Saint Louis, 1 av C. Vellefaux-75475 Paris–T : 0142499933 / F : 0142494576
Dr J. LEHMANN-CHE, SERVICE DE BIOCHIMIE Hôpital Saint Louis, 1 av C. Vellefaux-75475 Paris–T : 0142499931 / F : 0142499247

**BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE :
GENOTYPAGE EGFR**

PATIENT

☐ Monsieur

☐ Madame

Nom :

Né(e) :

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 : (double compte-rendu)

Type de prélèvement :

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

nécrose :

fibrose :

Pathologiste validant l'analyse morphologique :

CLINICIEN REFERENT (coordonnées précises)

Nom :

Adresse :

RECOMMANDATIONS DE TRANSPORT ET DELAI DE RENDU DE RESULTAT

* A leur convenance, les laboratoires peuvent rajouter ici (à la suite) des Items spécifiques à leur laboratoire.

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

HOPITAL SAINT-LOUIS

1, AVENUE CLAUDE VELLEFAUX, 75475 PARIS CEDEX 10
STANDARD : 01 42 49 49 49 INTERNATIONAL : 33 1 42 49 49 49

SERVICE DE BIOCHIMIE (Pr H. DE THE) - CONTACT : DR J. LEHMANN-CHE - TEL ACCUEIL : 01 42 49 93 85 / FAX : 01 42 49 92 47

SERVICE DE PATHOLOGIE (Pr A. JANIN) - CONTACT : DR V. MEIGNIN - TEL SECRETARIAT : 01 42 49 99 33 / FAX: 01 42 49 49 22

Informations pratiques concernant la recherche du statut mutationnel de EGFR dans les carcinomes non à petites cellules du poumon à l'hôpital Saint Louis

Pour quels patients :

Patients atteints de carcinome non à petites cellules du poumon (CBNPC).
Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale «Poumon/ CBNPC - EGFR/mutations activatrices» de l'AP-HP.

Dans quels buts :

Définir l'éligibilité à un traitement ciblé anti EGFR par gefitinib (Iressa®)
La présence de mutations activatrices sur les exons 18, 19, 20 et 21 du gène EGFR est prédictive d'une réponse au traitement.
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 ou AFA, 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). Cette donnée chiffrée **doit** être indiquée dans la fiche de prescription pour une interprétation pertinente des résultats.

Où adresser sa demande :

Votre demande sera traitée par la plateforme de génétique moléculaire de l'hôpital St Louis.

➔ Dans le laboratoire d'anatomie pathologique, le prélèvement sera réceptionné et enregistré et des coupes tissulaires seront ensuite réalisées

Référent : Dr Véronique Meignin, veronique.meignin@sls.aphp.fr tel : 01 42 49 45 76

Laboratoire : Service d'anatomie pathologique
Hôpital Saint Louis
1 av Claude Vellefaux
75 475 Paris cedex 01
Réception : 01 42 49 41 35

➔ ces coupes de tissus seront ensuite adressées au laboratoire d'oncologie moléculaire qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation :

Référents : Dr J. Lehmann-Che, jacqueline.lehmann-che@sls.aphp.fr tel : 01 42 49 98 58
ou Dr Hany Soliman, hany.soliman@sls.aphp.fr tel : 01 42 49 43 90

Laboratoire : Service de Biochimie
Hôpital Saint Louis
1 av Claude Vellefaux

75 475 Paris cedex 01
Réception : 01 42 49 93 85/ fax 01 42 49 92 47

Que faut-il envoyer :

- au laboratoire d'anatomie pathologique :
 - le bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales (par rapport aux cellules totales de l'échantillon)
 - 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.
- au laboratoire d'oncologie moléculaire :
 - une copie du Bon de demande d'examen
 - 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 en anatomie pathologique, un délai **maximum de 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 réadressé secondairement.

Quelles techniques utilisons-nous ?

- au service d'anatomie pathologique :
 - une coupe HES sera réalisée à partir du bloc transmis afin de sélectionner la zone la plus richement tumorale (la richesse tumorale pourra être augmentée par macrodissection).
 - 6 coupes de 10µm seront réalisées et transmises au laboratoire d'oncologie moléculaire.
- au service d'oncologie moléculaire :
 - l'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.
 - l'analyse systématique se fait en duplicate
 - En première intention** sont recherchées les mutations les plus fréquentes :
 - pour l'exon 19 : par la technique d'analyse de fragment détectant les délétions/insertions
 - pour l'exon 21 :
 - en **discrimination allélique** pour la mutation L858R sur LC480 (Roche) ou Taqman 7500 (Applied).
 - Cette technique est sensible (5%) mais ne détecte que la mutation recherchée
 - une analyse parallèle, par la technique de **HRM** sur LC480 (Roche) suivie d'une séquence sur 3130 (Applied) si nécessaire.
 - Cette technique est une méthode de sensibilité intermédiaire mais sans *a priori* sur la mutation à détecter. Il sera donc possible de détecter des mutations plus rares.
 - Secondairement**, en cas d'absence de mutation sur ces 2 exons, la recherche de mutations sur l'exon 18 et 20 est lancée :
 - exon 18 : en parallèle et en duplicate
 - discrimination allélique pour la mutation G719 sur LC480 (Roche) ou Taqman 7500 (Applied).
 - technique de **HRM** sur LC480 (Roche) suivie d'une séquence sur 3130 (Applied) si nécessaire.
 - exon 20 : en duplicate : technique de **HRM** sur LC480 (Roche) suivi d'une séquence sur 3130 (Applied).

A noter que le statut mutationnel de KRAS est systématiquement réalisé en parallèle. Les mutations EGFR et KRAS sont mutuellement exclusives.

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 |