

## BON DE TRANSPORT ET DE DEMANDE D'EXAMEN DE PATHOLOGIE MOLECULAIRE

### Hôpital Universitaire Ambroise Paré

9 Avenue Charles de Gaulle – 92104 Boulogne Cedex

**Service de Pathologie - Chef de Service : Pr J.F. Emile – Tel secrétariat : 01 49 09 57 28**

### PATIENT

Nom d'usage :

Nom de naissance :

Prénom :

Date de naissance :

Sexe : ☐ Féminin ☐ Masculin

### EXPEDITEUR / CORRESPONDANTS

**Pathologiste** (Nom, prénom, adresse, email, téléphone) :

**Clinicien référent** (Nom, prénom, adresse, email, téléphone) :

### MATERIEL TRANSMIS

Référence dans le labo d'origine :

Localisation primitive :

Nature de l'échantillon :

☐ Bloc(s) paraffine (**recommandé**)

Nombre :

☐ Bloc congelé

☐ Autre (Préciser) :

☐ Tumeur primitive

☐ Métastase

☐ Tissu non tumoral

Prélèvement :

☐ Pièce opératoire

☐ Biopsie

☐ Cytologie

### ANALYSE DEMANDEE

☐ KRAS / NRAS

☐ KIT

☐ MSI

☐ BRAF

☐ PDGFRA

☐ MDM2 (FISH)

☐ NRAS

☐ EGFR

☐ Darier-Farrand (FISH)

☐ CTNNB1

### TRANSPORTEUR

Date de départ :

Température de transport :

☐ Poste. Préciser le type d'envoi :

☐ Température ambiante

☐ Autre. Préciser :

☐ Dans la glace

☐ Carboglace

### RECEPTION

**Date de réception** :

☐ Conforme aux indications de l'expéditeur

☐ Non conforme aux indications de l'expéditeur. Préciser :

Visa :

**Hôpital Universitaire Ambroise Paré**

9 Avenue Charles de Gaulle – 92104 Boulogne Cedex

Service de Pathologie - Chef de Service : Pr J.F. Emile – Tel secrétariat : 01 49 09 57 28

**FICHE D'INFORMATION CONCERNANT LES ANALYSES EN PATHOLOGIE MOLECULAIRE A L'HOPITAL AMBROISE PARE**

**Quelles analyses :**

Les analyses réalisées en routine à l'hôpital Ambroise Paré :

- **Adénocarcinomes colorectaux :**
  - 1) instabilité des microsatellites
  - 2) mutations *KRAS*, *NRAS* et *BRAF*
- **Tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) :** mutations de *KIT* et *PDGFRA*
- **Mélanomes :** mutations *BRAF*, *NRAS* et *KIT*
- **Histiocytoses :** mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1*
- **Sarcomes (techniques de FISH) :** amplification de *MDM2*, t(17,22)
- **Tumeurs desmoïde :** mutation de *CTNNB1*
- **Carcinomes pulmonaires non à petites cellules :**
  - Recherche des mutations *KRAS* et *BRAF*, et typage moléculaire par Séquençage Nouvelle Génération (en collaboration avec HEGP).
  - Recherche par immunohistochimie du réarrangement ALK.

Pour toute autre demande d'analyse, nous contacter au préalable.

**Pour quels patients et dans quels buts :**

Les indications sont détaillées dans les fiches médicales correspondantes disponibles sur le site Oncomolpath.

**Sur quels prélèvements :**

- Tumeur primitive ou métastatique.
- Prélèvement tissulaire fixé (préférentiellement formol tamponné) et inclus en paraffine.
- Le prélèvement doit être aussi riche que possible en cellules tumorales.

**Où adresser sa demande :**

Service de pathologie - Pathologie Moléculaire - Hôpital Ambroise Paré

Adresse indiquée sur le bordereau de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)

Contacts privilégiés indiqués à la fin du présent document.

**Que faut-il envoyer :**

Comme indiqué sur le bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>), l'échantillon à analyser doit être :

- Bloc(s) d'inclusion en paraffine\* + 1 lame HES ayant servie au diagnostic notamment pour les biopsies (En cas d'échec, un bloc congelé pourra être demandé)

\* Pour le statut MSI, envoyer 1 bloc comportant tissu tumoral et muqueuse normale ou 2 blocs (1 tumoral et l'autre muqueuse normale)

Pour tout autre type d'échantillon, nous contacter au préalable.

Toujours joindre à l'échantillon :

- bon de transport et demande d'examen (IO-ACA-PRE-FM-003) disponible sur le site OncoMolPath (<http://oncomolpath.aphp.fr/>)
- Une copie du compte rendu (CR) original d'anatomie pathologique qui peut dispenser de remplir certaines rubriques du bon de demande d'examen si elles sont présentes sur le CR.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement, l'un de nos objectifs qualité est de répondre à 90% des demandes dans un délais de 21 jours (maximum 28 jours selon les recommandations de l'INCa). Le résultat est adressé aux pathologistes et aux correspondants qui sont mentionnés dans le bon de transport et demande d'examen.

En cas de situation d'urgence, la mention **URGENT** doit être ajoutée sur le bon de transport et de demande d'examen pour de réduire au maximum le délai de rendu.

Quelles techniques utilisons-nous ?

*Contrôle histologique :*

Sur coupe 4  $\mu$ m colorée à l'HES. Validation du diagnostic histologique. Evaluation du pourcentage de cellules tumorales. Sélection, si besoin, de la zone tumorale à macro-disséquer ou à prélever sélectivement sur le bloc.

*Macro-dissection / prélèvement sélectif : (Pour les analyses « en tube » uniquement)*

Pour tout échantillon fixé dont le pourcentage estimé de cellules tumorales est inférieur à 50% et qui peut être augmenté par macro-dissection. Dans un environnement confiné, si besoin sous contrôle à la loupe binoculaire.

*Extraction de l'ADN : (Pour les analyses « en tube » uniquement)*

Digestion en protéinase K sous agitation constante à 56°, puis KIT Qiagen®

*Analyses « en tube »*

- Mutations de *KRAS* et *BRAF* pour tumeurs colorectales : Discrimination allélique par PCR temps réel. Recherche des mutations G12S, G12R, G12C, G12D, G12A G12V et G13D de *KRAS* et V600E/K de *BRAF* uniquement. Sensibilité de 5% à 10%. En cas de négativité, analyse par séquençage sanger ciblée sur les codons 12, 13, 61, 117, 146 de *KRAS* et *NRAS*.
- Mutations de *BRAF* et *NRAS* pour tumeurs mélanocytaires et histiocytaires : Pyroséquençage ciblant les codons 600 de *BRAF* et 61 de *NRAS*, puis séquençage Sanger des codons 12 et 13 de *NRAS* si pas de mutations.
- Mutation de *MAP2K1* pour tumeurs histiocytaires : Analyse de taille des amplicons (LAPP) des exons 2 et 3, et séquençage Sanger.
- Mutations de *CTNNB1* pour tumeurs desmoïdes : Pyroséquençage ciblant les codons 41 et 45
- Mutations de *KIT* pour suspicion de GIST ou mélanome : Analyse des exons 9, 11, 13 et 17 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de *PDGFRA* pour suspicion de GIST : Analyse des exons 12, 14 et 18 par analyse de taille des amplicons (LAPP) et/ou séquençage Sanger.
- Mutations de l'*EGFR* : discrimination allélique + sonde PNA pour les substitutions L858R et T790M (sensibilité de 5%). Analyse de fragment pour les délétions de l'exon 19 et les insertions de l'exon 20 (sensibilité de 10%). En cas de négativité, séquençage pour les codons 719 à 986 (sensibilité de 30%).  
En collaboration avec le service de Biochimie de l'hôpital Européen George Pompidou
- Statut MSI / Recherche d'un déficit du système de réparation des mésappariements (système MMR) : Analyse de la taille de fragment des microsatellites BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27.  
En collaboration avec le service de Biochimie et Génétique Moléculaire de notre pôle.

Analyses *in situ* :

- Statut MSI / Déficit en réparation de l'ADN (MMR) : Immunohistochimie avec les Anti- MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6 (clones G168-728, A16-4, FE11 et 44/MSH6) sur automate Bond-Max.
- Statut BRAF : Immunohistochimie avec l'anti-BRAF VE1 sur automate Bond-Max.
- Amplification de MDM2 : FISH
- Translocation t(17;22) dans les dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand : FISH

Contacts :

---

- Carcinome colorectal : Statut MSI / Recherche d'un déficit du système MMR :  
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28  
Courriel: [catherine.julie@aphp.fr](mailto:catherine.julie@aphp.fr)
- Carcinome colorectal : Mutations de *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* :  
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28  
Courriel: [jean-francois.emile@uvsq.fr](mailto:jean-francois.emile@uvsq.fr)
- GIST : Mutations de *KIT* et *PDGFRA* :  
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28  
Courriel: [jean-francois.emile@uvsq.fr](mailto:jean-francois.emile@uvsq.fr)
- Mélanome : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *KIT* :  
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28  
Courriel: [jean-francois.emile@uvsq.fr](mailto:jean-francois.emile@uvsq.fr)
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :  
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28  
Courriel: [jean-francois.emile@uvsq.fr](mailto:jean-francois.emile@uvsq.fr)
- Carcinome bronchopulmonaire : Mutations de l'*EGFR* :  
Dr Catherine Julié, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 26 / 28  
Courriel: [catherine.julie@aphp.fr](mailto:catherine.julie@aphp.fr)  
Dr Hélène Blons service de Biochimie, HEGP, tél: 01 56 09 39 35  
Courriel: [helene.blons@aphp.fr](mailto:helene.blons@aphp.fr)
- Amplification MDM2 et translocations t(17, 22) :  
Dr Cristi Marin, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 27 / 28  
Dr Ute Zimmermann, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 24 / 28  
Dr Z Hélias-Rodzewicz, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 56 88  
Courriel: [cristi.marin@aphp.fr](mailto:cristi.marin@aphp.fr)
- Histiocytoses : Mutations de *BRAF*, *NRAS* et *MAP2K1* :  
Pr Jean-François Emile, service d'anatomie et pathologie, tél 01 49 09 57 25 / 28  
Courriel: [jean-francois.emile@uvsq.fr](mailto:jean-francois.emile@uvsq.fr)

## FICHE MEDICALE

Pathologie	Analyse
Tumeur Stromale Gastro-Intestinale (GIST)	<i>KIT et PDGFRA</i> / mutations

### But : Diagnostic et théranostic

Confirmation du diagnostic de tumeur stromale gastro-intestinale (GIST) et/ou prédiction de la réponse tumorale aux inhibiteurs de récepteur tyrosine kinase (RTK). Le diagnostic repose avant tout sur l'histologie et l'immunohistochimie.

### Indications

Analyse nécessaire : 1) Patients ayant une suspicion de GIST, mais KIT négative en immunohistochimie quel que soit le stade, 2) Patients atteints de GIST à un stade avancé (non résécable ou métastatique) avant traitement par inhibiteur de RTK. 3) Traitement adjuvant des patients opérés à risque significatif de rechute.

Analyse recommandée :

Analyse exploratoire: 1) Patients ayant une indication de traitement néoadjuvant pour GIST, 2) Patients ayant une GIST de faible ou très faible risque de malignité, 3) Patients développant une résistance secondaire à un traitement par RTK.

### 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 congelée, mais le plus souvent possible également sur tumeur fixée en formol tamponné pendant moins de 48h.
- Contrôle histologique indispensable de la cellularité de l'échantillon tumoral.

### 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. Screening (LAPP, DHPLC, HRM,...) des mutations les plus fréquentes.
2. Séquençage des produits d'amplification des exons 9, 11, 13 et 17 de *KIT* et 12, 14 et 18 de *PDGFRA*.

### Délai moyen de rendu de résultat

7-14 jours

### Informations complémentaires

Diagnostic de GIST KIT négative en immunohistochimie : la recherche de mutation de *KIT* et *PDGFRA* est nécessaire pour confirmer le diagnostic (consensus d'expert) (Casali & Blay 2010).

Remarque : l'immunohistochimie avec l'anticorps DOG-1 est également recommandée.

Traitement par RTK de patients atteints de GIST avancée : la recherche de mutation de *KIT*

et PDGFRA est nécessaire car :

1. En cas de présence d'une mutation AY502\_503 de l'exon 9 de KIT, les patients recevant une posologie de 800mg/j ont une survie sans progression significativement plus longue que ceux recevant la dose usuelle de 400mg/j.
2. La mutation D842V de l'exon 18 de PDGFRA induit une résistance in vitro à l'imatinib, et cela est probablement également le cas in vivo.
3. Les patients ayant une mutation de l'exon 11 de KIT ont une meilleure réponse à l'imatinib que les autres patients.

Traitement par RTK en adjuvant de patient opérés pour GIST localisée : Des données ont été présentées à l'ASCO 2010 (Corless et coll.) suggérant que le bénéfice du traitement adjuvant était significatif pour les patients ayant une mutations de l'exon 11 de KIT, mais pas pour ceux ayant une mutation de l'exon 18 de PDGFRA.

### Références (sur les indications et les techniques)

1. Blay JY, Landi B, Bonvalot S, Monges G, Ray-Coquard I, Duffaud F, Bui NB, Bugat R, Chayvialle JA, Rougier P, Bouché O, Bonichon F, Lassau N, Vanel D, Nordlinger B, Stoeckle E, Meeus P, Coindre JM, Scoazec JY, Emile JF, Ranchère D, Le Cesne A.  
[Recommendations for the management of GIST patients]  
Bull Cancer. 2005 Oct 1;92(10):907-18.
2. Emile JF, Scoazec JY, Coindre JM.  
[Gastrointestinal stroma tumors (GIST): what is new in 2009?]  
Ann Pathol. 2009 Feb;29(1):20-3. Epub 2009 Jan 30.
3. Gastrointestinal Stromal Tumor Meta-Analysis Group (MetaGIST).  
Comparison of two doses of imatinib for the treatment of unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of 1,640 patients.  
J Clin Oncol. 2010 Mar 1;28(7):1247-53.

### Auteurs

- |   |               |
|---|---------------|
| • Rédacteurs V1 : J.F. Emile, B. Landi, M. Pocard | le 27/8/2010  |
| • Relecteurs : S. Chaussade, C. Guettier          | le 01/9/2010  |
| • Validation Comité de Coordination               | le 06/10/2010 |