

**GROUPE HOSPITALIER COCHIN – HOTEL DIEU – ST VINCENT DE PAUL -
BROCA
SITE HOTEL-DIEU**

1 place du Parvis Notre Dame, 75004 Paris

Contact : Pr Diane DAMOTTE, SERVICE DE PATHOLOGIE Hôpital Hôtel-Dieu – Tel secrétariat : 01 42 34 87 13

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 EGFR**

MOTIF DE LA DEMANDE : ☐ Stratégie / Adaptation thérapeutique ☐ 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 ☐ AFA ☐ Autres (préciser): ** PAS DE BOUIN

DECALCIFICATION : ☐ Non ☐ Oui (préciser la méthode) :

Type de prélèvement : ☐ Cytologie ☐ Biopsie ☐ Pièce opératoire

Site du prélèvement (organe) : Date du prélèvement :

Référence Laboratoire : Diagnostic histologique :

Nature (coupes, blocs, lames....) :

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

% de noyaux de cellules tumorales :

Commentaire (nécrose, fibrose, autre.) :

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

HOTEL DIEU

1 PLACE DU PARVIS DE NOTRE DAME, 75004 PARIS

SERVICE DE PATHOLOGIE (Pr TJ MOLINA)

CONTACT : Pr Diane DAMOTTE

TEL SECRETARIAT : 01 42 34 87 13 / Fax : 01 42 34 86 41

Informations pratiques concernant la recherche du statut mutationnel de EGFR dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC) à l'Hôtel-Dieu

Pour quels patients :

Patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules stade IIIB ou IV

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

Dans quels buts :

Identifier les patients susceptibles de bénéficier d'un traitement ciblé anti EGFR par gefitinib en première ligne.

La présence de mutations activatrices sur l'exon 19 (micro-délétion préservant le cadre de lecture) et sur l'exon 21 (mutation faux sens L858R) 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, le liquide de Bouin est formellement exclu ; éviter la surfixation) et incluse en paraffine.

Le prélèvement doit comporter **dans la zone analysée** (éventuellement après macro-dissection) **au minimum 30% (et si possible plus de 50%) de cellules tumorales** (par rapport au nombre total de cellules). Cette évaluation peut être faite par le médecin anatomo-pathologiste demandeur et précisé sur le bon de commande.

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
- en cas de prélèvement de petite taille et possible épuisement du bloc, donner les lames blanches en surplus (au moins 3 à 4 lames)
- **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 Diane DAMOTTE
Laboratoire : Hôtel Dieu
Département de Pathologie (A3 1^{er} étage)
1 Place du Parvis de Notre Dame
75004 Paris
Réception : 01 42 34 87 15/ 01 42 34 86 41

- ➔ 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 Pr Diane Damotte (diane.damotte@htd.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 Diane Damotte

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 macrodissection) sur un microtome : 5 à 10 coupes de 10µm sont réalisées et transférées dans un tube identifié.
- ➔ - l'extraction de l'ADN est réalisée selon un protocole standardisé. L'ADN est ensuite dosé en spectrophotométrie dans le service.
- ➔ - L'analyse moléculaire est effectuée dans **le laboratoire du Pr Pierre Laurent-Puig à l'HEGP**. La recherche de mutation L858R (exon 21) est faite en duplicate, en **discrimination allélique** à l'aide d'une sonde couvrant la mutation à rechercher, en présence et en absence d'une sonde bloquant l'amplification de l'allèle sauvage (sonde PNA) 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 la mutation recherchée.
- ➔ - la recherche de mutation de l'exon 19 est faite par amplification de l'ADN tumoral en PCR fluorescente et analyse de la taille du fragment amplifié par électrophorèse capillaire sur séquenceur Applied Biosystems. Cette technique permet de détecter la présence 10 à 20 % d'allèles mutés.

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

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 cosigné 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
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 |