

GROUPE HOSPITALIER STARTT

(SAINT-ANTOINE – ROTHSCHILD – TENON - TROUSSEAU)

SITE SAINT-ANTOINE 184, rue du Faubourg Saint-Antoine - 75571 PARIS Cedex 12

SERVICE DE PATHOLOGIE : Pr JF.Fléjou – Dr P.Cervera

Secrétariat : 01 49 28 21 77

GENETIQUE MOLECULAIRE : Dr O. Lascols - Dr P.Cervera

Secrétariat : 01 49 28 28 09

BON DE DEMANDE D'EXAMEN EN ONCOLOGIE MOLECULAIRE

PATIENT

☐ Monsieur

☐ Madame

Nom :

Née :

Prénom :

Date de naissance :

PATHOLOGISTE DEMANDEUR

NOM :

ADRESSE :

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

CONTEXTE DE LA DEMANDE :

DATE DE LA DEMANDE :

MATERIEL TRANSMIS : Double du compte-rendu et Lame HES à JOINDRE A LA DEMANDE

FIXATEUR UTILISE* : ☐ Formol ☐ Formol neutre ☐ AFA ☐ 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

% de noyaux de cellules tumorales :

% superficie de plages acellulaires colloïde : nécrose : fibrose :

Pathologiste validant l'analyse morphologique :

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

GROUPE HOSPITALIER STARTT

(SAINT-ANTOINE – ROTHSCHILD – TENON - TROUSSEAU)

SITE SAINT-ANTOINE 184, rue du Faubourg Saint-Antoine - 75571 PARIS Cedex 12

SERVICE D'ANATOMIE ET DE CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES (Pr J-F Flejou)

Contact : Dr P.Cervera Tél : 01 49 28 20 18 Secrétariat : 01 49 28 21 70 Fax: 01 49 28 28 78

LABORATOIRE COMMUN DE BIOLOGIE ET GENETIQUE MOLECULAIRES (Dr O. Lascols)

Contact : Dr P.Cervera Secrétariat : 01 49 28 28 09 Fax : 01 49 28 22 06

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 - KRAS/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 - KRAS/mutations » de l'APHP.

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%** 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 à l'hôpital Saint-Antoine dans le service d'anatomie et de cytologie pathologiques.

→ Le prélèvement sera réceptionné, validé et préparé pour l'analyse moléculaire :

Référent : Dr Pascale Cervera (01 49 28 20 18 ; pascale.cervera@sat.aphp.fr)

Laboratoire : Service d'anatomie et cytologie pathologiques

Hôpital Saint -Antoine

184, rue du faubourg Saint-Antoine

75571 Paris cedex 12

Réception : 01 49 28 48 47

→ Les coupes de tissus seront ensuite adressées, par l'anatomo pathologiste de la plateforme au laboratoire d'oncologie moléculaire qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation :

Référent : Dr Pascale Cervera (01 49 28 28 09 ; 01 49 28 21 72) pascale.cervera@sat.aphp.fr

Laboratoire : Laboratoire commun de biologie et génétique et moléculaires (Dr O. Lascols)

Secrétariat : 01 49 28 28 09

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 de la fiche de prescription.
- 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 pathologiste demandeur et clinicien(s) référent(s) qui seront mentionnés 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 (5 jours)

Le bloc tumoral vous sera réadressé secondairement.

Quelles techniques utilisons-nous

→ Au service d'anatomie pathologique :

- le bloc tumoral sera coupé et analysé en **HES** pour sélection de la zone la plus richement tumorale (la richesse tumorale pourra être augmentée par macrodissection).
- 3 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 sur colonne Qiagen après traitement de la coupe paraffinée par la protéinase K.
- l'analyse systématique se fait en duplicate, par la **technique HRM** sur LC480 (Roche) (technique sensible de 5 à 10%), suivie si mutation par un **séquençage** des produits d'amplification HRM pour déterminer le type de mutation. Cette technique est une méthode de sensibilité intermédiaire mais sans *à priori* sur la mutation à détecter. Il sera donc possible de détecter des mutations plus rares, ne faisant pas partie des 7 mutations consensuellement recherchées.

En cas de résultats discordants, il est réalisé une **discrimination allélique** à l'aide de 7 sondes couvrant les 7 mutations à rechercher (G12S, G12R, G12C, G12D, G12A G12V et G13D) sur LC480 (Roche) ou Taqman 7700 (Applied). Cette technique est sensible (5%) mais ne détecte que les mutations recherchées (citées ci-dessus).

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 |