

**Guide des analyses réalisées au laboratoire d'Oncopharmacologie
Centre Antoine Lacassagne (CAL) – Nice**

à l'usage du personnel médical et soignant CAL et hors CAL

www.centreantoinelacassagne.org

Pr Joël Guigay, directeur

Dr Isabelle Birtwisle-Peyrottes, responsable du pôle des laboratoires

Dr Gérard Milano, responsable du laboratoire d'Oncopharmacologie

Dr Marie-Christine Etienne-Grimaldi, pharmacien biologiste

Tel : 04 92 03 15 55

Mise à jour Février 2016



Sommaire

Objectif	2
Informations pratiques.....	3
Modalités d'accès informatique pour les prescripteurs du CAL	4
I. Analyses de pharmacogénétique	
Activité DPD lymphocytaire	6
Génotypage de la DPYD.....	7
Génotypage de l'UGT1A1.....	8
II. Analyses tumorales	
Recherche des mutations RAS	10
Recherche des mutations BRAF	11
Recherche des mutations PIK3CA	12
Recherche des instabilités microsatellitaires (statut MSI/MSS)	13
Analyse uPA et PAI-1	14



OBJECTIF

Ce guide a pour objet de renseigner l'étendue des analyses hospitalières réalisées au laboratoire d'Oncopharmacologie du Centre Antoine Lacassagne, et préciser les modalités de prélèvement, de conservation et d'acheminement des échantillons biologiques.



INFORMATIONS PRATIQUES

Recommandation générale :

Tout prélèvement doit être dûment identifié (nom, prénom, date de naissance, sexe, N° dossier du patient et date du prélèvement) et accompagné d'une prescription signée par un médecin habilité.

Réception des prélèvements:

Les prélèvements sont réceptionnés au Laboratoire d'Oncopharmacologie du lundi au jeudi entre 8h15 et 17h et le vendredi entre 8h15 et 16h30. En dehors de ces heures, les prélèvements doivent être adressés au Dépôt des Prélèvements (ouvert entre 7h et 18h du lundi au vendredi, tel 04 92 03 16 07).

Analyses de pharmacogénétique :

Toute prescription de recherche de polymorphisme génétique doit donc être accompagnée d'un consentement signé (modèle fourni par le laboratoire d'Oncopharmacologie). La recherche de caractéristiques génétiques constitutionnelles rend réglementairement obligatoire la signature d'un consentement par le patient et le médecin prescripteur. Un double est conservé par le patient. L'absence de consentement est un motif de refus de l'analyse.

Analyses tumorales sur blocs :

Les blocs tumoraux inclus en paraffine doivent être fixés dans du formol tamponné. Les fixateurs acides (formol acide, Bouin, glutaraldehyde) dégradent l'ADN et sont donc contre-indiqués pour les analyses de génétique tumorale.



Modalités d'accès informatique pour les prescripteurs du CAL

1) Manuel de Prélèvements du Pôle des Laboratoires du CAL

Disponible sur [KALIWEB](#) / « LES INDISPENSABLES »

2) Formulaire de consentement pour analyses de pharmacogénétique

Disponible sur [KALIWEB](#) / Droits et information des patients / Consentements / Oncopharmacologie

3) Accès aux résultats

Disponibles sur [CLINICOM](#) :

- Tous les résultats du laboratoire d'Oncopharmacologie (à l'exception des Instabilités microsatellites) sont accessibles dans le dossier Activités médicales / Multimédia / Oncopharmacologie.
- Les résultats des Instabilités Microsatellites (analyses réalisées conjointement avec l'unité d'anatomocytopathologie) sont accessibles dans la valisette « Anapath » et dans la valisette « Chronologie ».



Analyses de pharmacogénétique



Activité DPD lymphocytaire

Intérêt : La DPD (dihydropyrimidine deshydrogenase), enzyme-clé du catabolisme du 5FU, traduit la capacité d'élimination du 5FU. Un déficit enzymatique mesuré dans les lymphocytes permet d'identifier les sujets risquant de développer une toxicité sévère au 5FU (ou à la capécitabine) chez qui il faudra réduire la dose de 5FU, voire ne pas l'administrer.

Horaire du prélèvement: L'activité DPD présente un rythme circadien, obligeant d'effectuer le prélèvement sanguin le matin entre 8h et 14h30 au plus tard, avant traitement ou 8 jours au moins après l'administration de fluoropyrimidine, lorsque la numération des lymphocytes est proche de la normale.

Prélèvement : 6 tubes de 4 ml sur héparinate de lithium sans gel (bouchon vert-noir). Cette analyse, réalisée sur des lymphocytes viables, nécessite les précautions suivantes : les tubes doivent immédiatement être placés au contact d'eau + glace (ou dans un conditionnement réfrigéré équivalent) et être acheminés au laboratoire dans les 30 minutes, et ce AVANT 15h.

Le non-respect des conditions d'acheminement (tubes réceptionnés après 15h ou tubes ayant traînés à température ambiante ($\geq 2h$) sont des motifs de refus de l'examen. Dans ce cas, seule la recherche de polymorphisme du gène *DPYD* pourra être réalisée si le consentement pour analyse pharmacogénétique est joint à la prescription (voir page suivante).

Interprétation:

Dans la population générale, la valeur moyenne de l'activité DPD mesurée le matin est de 0,225 nmol/min/mg de protéine. Une activité inférieure à 0,100 nmol/min/mg de protéine traduit un déficit enzymatique, attirant l'attention sur un risque accru de toxicité au 5FU i.v. ou à la capécitabine. Pour les patients présentant une activité DPD déficiente ($< 0,100$ nmol/min/mg de protéine), la prescription de fluoropyrimidine doit être adaptée en fonction du contexte clinique et de la balance bénéfice-risque, en particulier pour ceux présentant un déficit marqué (activité DPD $< 0,050$ nmol/min/mg de protéine).

Délai normal de rendu du résultat : 7 jours en moyenne.

(Etienne MC et al. J Clin Oncol 1994, 12: 2248 ; Milano G et al. Pharmacogenetics 1994, 4: 301)



Génotypage de la *DPYD*

Intérêt : La DPD (dihydropyrimidine deshydrogenase), enzyme-clé du catabolisme du 5FU, traduit la capacité d'élimination du 5FU. Cet enzyme est codé par le gène *DPYD* qui présente de nombreux polymorphismes fonctionnels, mais peu fréquents. Parmi ces polymorphismes, trois variants codent pour un allèle déficient (activité enzymatique quasi nulle) et ont démontré leur impact sur le risque de toxicité aux fluoropyrimidine: le variant *2A (IVS14+1G>A = c.1905G>A, porté à l'état hétérozygote par 1,5% des Caucasiens), le variant D949V (c.2846A>T porté à l'état hétérozygote par 1,5% des Caucasiens) et le variant *13 (I560S = c.1679T>G porté à l'état hétérozygote par 0,2-0,3% des Caucasiens).

Les variants fonctionnels du gène *DPYD* étant peu fréquents, la recherche d'un déficit en DPD se fait en 1^{ère} intention par le phénotypage de l'enzyme au niveau lymphocytaire. Le génotypage de la *DPYD* n'est réalisé que dans le cas où le phénotypage n'a pas été possible, ou secondairement chez les patients présentant un déficit enzymatique (activité lymphocytaire < 0,100 nmol/min/mg de protéines), à titre informatif.

Prélèvement : Prélèvement sanguin (4 ml) sur tube EDTA (bouchon violet). Stockage et transport à température ambiante (ou conditionnement réfrigéré).

Horaire : Pas de contrainte particulière (ni de nécessité d'être à jeun).

Consentement signé obligatoire (analyse de génétique constitutionnelle).

Interprétation : Les sujets porteurs d'un allèle déficient présentent un risque accru de toxicité au 5FU i.v. et à la capécitabine : la prescription de fluoropyrimidine doit être adaptée chez ces patients en fonction du contexte clinique et de la balance bénéfico-risque. Les sujets porteurs de 2 allèles déficients sont à risque de toxicité très sévère dès le 1^{er} cycle de fluoropyrimidine (fluoropyrimidines contre-indiquées).

Délai normal de rendu du résultat : 6 à 10 jours.

(Van Kuilenburg A et al. *Pharmacogenetics* 2002, 12:555 ; Caudle KE et al. *Clin Pharm Ther* 2013, 94(6) :640)



Génotypage de l'UGT1A1 (variant *28)

Intérêt : L'uridine diphosphate glucuronosyltransférase 1A1 (*UGT1A1*) est l'enzyme permettant l'inactivation du métabolite actif de l'irinotécan, le SN38. Les sujets porteurs d'un variant déficient ont une capacité réduite d'élimination et sont à risque de toxicité hématologique et digestive pour des doses d'irinotécan ≥ 180 mg/m². Le variant *28 est le polymorphisme fonctionnel le plus fréquent chez les caucasiens (environ 45% de sujets porteurs hétérozygotes et 10% de porteurs homozygotes). Ce variant code pour un allèle déficient (activité enzymatique réduite). Ce variant présente 7 répétitions TA au niveau de la TATA box, noté (TA)₇, alors que le variant commun *1 présente 6 répétitions (TA)₆.

Prélèvement : Prélèvement sanguin (4 ml) sur tube EDTA (bouchon violet). Stockage et transport à température ambiante (ou conditionnement réfrigéré).

Horaire : Pas de contrainte particulière (ni de nécessité d'être à jeun).

Consentement signé obligatoire (analyse de génétique constitutionnelle).

Interprétation :

Chez les sujets homozygotes *28/*28, le risque de toxicité à l'irinotécan est significativement augmenté : une réduction de la dose standard d'irinotécan est recommandée chez ces patients en fonction du contexte clinique. Une intensification de dose (schéma ≥ 240 mg/m²) ne peut être envisagée que chez les sujets homozygotes *1/*1.

Délai normal de rendu du résultat : 6 à 10 jours.

(Etienne-Grimaldi MC et al. *Fundam Clin Pharmacol* 2015 ;29(3):219)



Analyses tumorales



Recherche des mutations RAS

Intérêt : Dans le cancer colorectal métastatique, la recherche des mutations RAS est un pré-requis pour la prescription d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur à l'EGF.

Prélèvement : Idéalement 4 copeaux de 20 µm de bloc tumoral fixé dans du formol tamponné et inclus en paraffine, contrôlé au plan histologique, et évalué pour le % de cellules tumorales. Ces copeaux doivent être placés dans un microtube *safelock* de 2 ml et transmis à température ambiante.

Mutations recherchées :

- KRAS : exon 2 (codons 12-13), exon 3 (codons 59 et 61), exon 4 (codons 117 et 146).
- NRAS : exon 2 (codons 12-13), exon 3 (codon 61).

Interprétation dans le cancer colorectal :

L'absence de mutation RAS est un pré-requis à l'administration d'anticorps anti-REGF.

La présence d'une mutation RAS est prédictive d'une résistance à un traitement par anticorps anti-REGF et contre-indique leur administration.

Délai normal de rendu du résultat : 6 à 10 jours.

(Lievre et al. *J Clin Oncol* 2008, 26 : 374; Douillard et al. *NEJM* 2013, 369 :1023 ; Allegra CJ et al. *J Clin Oncol* 2015 , 34 :179)



Recherche des mutations *BRAF*(codon 600)

Intérêt :

- Test pronostic dans le cancer colorectal et prédictif pour les traitements ciblant BRAF.
- Chez un patient avec tumeur colorectale présentant une instabilité microsatellite (MSI), la recherche de la mutation *BRAF* peut aider à discriminer entre la forme sporadique et la forme familiale : la présence d'une mutation *BRAF* dans une tumeur colorectale de phénotype MSI oriente sur le caractère sporadique de cette instabilité.

Prélèvement : Idéalement 4 copeaux de 20 µm de bloc tumoral fixé dans du formol tamponné et inclus en paraffine, contrôlé au plan histologique, et évalué pour le % de cellules tumorales. Ces copeaux doivent être placés dans un microtube *safelock* de 2 ml et transmis à température ambiante.

Mutations recherchées : *BRAF* exon 15 (codon 600).

Interprétation:

- La présence d'une mutation *BRAF* (codon 600) est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer colorectal.
- La présence d'une mutation *BRAF* (codon 600) peut orienter la prescription d'un inhibiteur BRAF (cancers colorectaux et mélanomes).

Délai normal de rendu du résultat : 6 à 10 jours.

(Ogino S et al. 2009, Gut 58 : 90)



Recherche des mutations *PIK3CA*

Intérêt : Aide à la décision thérapeutique pour l'administration de thérapies ciblées dans le cancer du sein.

Prélèvement : Idéalement 4 copeaux de 20 µm de bloc tumoral fixé dans du formol tamponné et inclus en paraffine, contrôlé au plan histologique, et évalué pour le % de cellules tumorales. Ces copeaux doivent être placés dans un microtube *safelock* de 2 ml et transmis à température ambiante.

Mutations recherchées : *PIK3CA* exon 9 (codons 542 et 545) et exon 20 (codon 1047)

Interprétation:

Les mutations *PIK3CA* peuvent être responsables de phénomènes de résistance aux traitements ciblant HER2 (trastuzumab en particulier).

Délai normal de rendu du résultat : 6 à 10 jours.

(Gagliato DM et al. Oncotarget 2016)



Recherche des instabilités microsatellitaires (MSI)

Intérêt :

- Facteur pronostique dans les cancers colorectaux.
- Evaluation du risque de syndrome HNPCC (Lynch).

Prélèvement : Idéalement 4 copeaux de 20 µm de bloc tumoral fixé dans du formol tamponné et inclus en paraffine, contrôlé au plan histologique, et évalué pour le % de cellules tumorales. Ces copeaux doivent être placés dans un microtube *safelock* de 2 ml et transmis à température ambiante.

Analyses réalisées conjointement par l'Unité d'ACP et le Laboratoire d'Oncopharmacologie :

- Analyse des 5 microsatellites du consensus de Bethesda II (BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27) en Oncopharmacologie (par PCR multiplex et électrophorèse capillaire).
- Analyse IHC de l'expression des protéines MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6 en ACP.

Interprétation :

- Une instabilité microsatellite (statut MSI) est un facteur de suspicion d'un syndrome d'HNPCC, lequel sera confirmé par une recherche de mutations au niveau constitutionnel (consultation d'oncogénétique). Chez un patient avec tumeur MSI, la recherche complémentaire de la mutation *BRAF* (codon 600) peut aider à discriminer entre la forme sporadique et la forme familiale : la présence d'une mutation *BRAF* dans une tumeur MSI oriente vers le caractère sporadique de cette instabilité.
- Chez un patient porteur d'un cancer colorectal sporadique, une instabilité microsatellite est à la fois un facteur de bon pronostic, en particulier dans les tumeurs du colon proximal (colon droit) et un facteur de « non-réponse » à une chimiothérapie à base de 5FU.

Délai normal de rendu du résultat : 15 jours en moyenne.

(Sinicrope FA et al. Clin Cancer Res 2012, 18 :1506 ; Sinicrope FA et al. J Clin Oncol 2013, 31 : 3664)



Analyses uPA et PAI-1 (cancer du sein)

Intérêt : uPA et PAI1 sont des protéases produites par les cellules tumorales et les cellules du micro-environnement. Elles interviennent dans la fibrinolyse (dégradation de la matrice extracellulaire), la migration, la prolifération et la néo-angiogénèse tumorale. Dans le cancer du sein sans atteinte ganglionnaire, c'est un facteur pronostique du plus haut niveau de preuve (niveau 1) qui aide à la décision thérapeutique.

Prélèvement : Biopsies tumorales congelées per opératoire, de 50 mg minimum (dans cryotybe). Le prélèvement doit être congelé (azote liquide) dans les 30 min suivant l'exérèse et contrôlé au plan anatomopathologique. Il doit être réalisé à distance d'une biopsie ou cytoponction (au moins 10 jours après et à distance de la cicatrice). Il est conservé dans l'azote liquide ou à -80°C (< -70°C).

Interprétation : Une concentration de uPA > 3 ng/mg de protéine et /ou de PAI-1 > 14 ng/mg de protéine indique un pronostic défavorable chez les patientes avec un cancer du sein N0.

Délai normal de rendu du résultat : 4 à 8 jours.

(Recommandations INCa dec 2013; Harbeck et al. Clin Breast Cancer 2004, 5 :348)

