

**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 2017



Sommaire

Objectif	3
Informations pratiques.....	4
Modalités d'accès informatique pour les prescripteurs du CAL	5
I. Analyses de pharmacogénétique	
Activité DPD lymphocytaire	7
Génotypage de la DPYD.....	8
Génotypage de l'UGT1A1.....	9
II. Analyses tumorales	10
Recherche des mutations RAS	11
Recherche des mutations BRAF	12
Recherche des mutations PIK3CA	13
Recherche des instabilités microsatellitaires (statut MSI/MSS)	14
Analyse plasmatique de la mutation T790M du gène EGFR	15
Recherche d'anomalies génétiques dans le cadre de la RCP Moléculaire du CAL	16
Analyse uPA et PAI-1 dans les cancers du sein	17



OBJECTIF

Ce guide a pour objet de renseigner l'étendue des analyses hospitalières réalisées au laboratoire d'Oncopharmacologie du Centre Antoine Lacassagne.

Ce guide précise les modalités de prélèvement, de conservation et d'acheminement des échantillons biologiques, les délais de rendu des résultats à réception des échantillons au Laboratoire d'Oncopharmacologie, ainsi que les cotations à la nomenclature.



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.

La tarification des examens peut être modulée en fonction des conventions spécifiques établies avec les établissements demandeurs.



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 : 8 jours en moyenne (analyse réalisée de façon hebdomadaire).
Cotation = BHN 1200 (P067 Liste complémentaire 2016)

(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.

Cotation = BHN 410 (M102, Liste complémentaire 2016)

(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.

Cotation = BHN 290 (M104, Liste complémentaire 2016)

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

Analyses tumorales

Les laboratoires d'anatomocytopathologie demandeurs d'analyses de mutations somatiques sur bloc tumoral peuvent, selon la modalité choisie :

- soit adresser le ou les blocs tumoraux au laboratoire d'anatomocytopathologie du CAL, qui réalisera les copeaux et leur validation tumorale, puis retournera le ou les blocs au laboratoire d'origine,
- soit adresser directement au laboratoire d'Oncopharmacologie les copeaux tumoraux, contrôlés au plan histologique et évalués pour leur % de cellules tumorales.

Dans tous les cas, 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.

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 : L'analyse est réalisée à partir de 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), exon 4 (codon 146).

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.
Cotation = BHN 1630 (N523, Liste complémentaire 2016)

(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)

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 : L'analyse est réalisée à partir de 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.

Cotation = BHN 430 (N501 Liste complémentaire 2016)

(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 : L'analyse est réalisée à partir de 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.

Cotation = BHN 430 (N531, RIHN 2016)

(Gagliato DM et al. Oncotarget 2016)

Intérêt : Identification d'une résistance acquise aux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant le REGF dans le cancer du poumon.

Prélèvement :

Pas de contrainte particulière d'horaire ou de nécessité d'être à jeun. Ce prélèvement sanguin peut être réalisé :

- Soit sur tube EDTA 9 ml, à transmettre à température ambiante au laboratoire dans les 30 minutes maximum,
 - Soit sur tube Cell-Free DNA BCT® 9 ml (Strect) à transmettre à température ambiante dans les 3 jours.
-

Mutation recherchée : EGFR T790M

Interprétation:

La mutation EGFR T790M traduit une résistance acquise aux traitements inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant le REGF. La sensibilité de la technique est de 0.1% (soit 1 copie mutée pour 1000 copies d'ADN analysées) ; elle est dépendante de la quantité d'ADN analysée. La présence de cette mutation permet d'envisager la prescription d'un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de cette anomalie.

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

Cotation = BHN 500 (N451, RIHN 2016)

(Tsimberidou AM et al. Clin Cancer Res 2014)

Intérêt : Mise en évidence d'anomalies moléculaires potentiellement ciblables chez des patients atteints de tumeurs solides métastasées ou en récurrence réfractaires aux traitements standards, ou avec tumeur rare (ou primitif inconnu), non accessibles à un traitement.

Prélèvement : L'analyse est réalisée à partir de 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 selon les recommandations de la 1^{ère} RCP moléculaire*

- Génotypage haut débit : Panel 26 gènes « Lung Carta » (250 mutations, Mass-Array Agena)

A venir (courant 2017) :

- Séquençage NGS : Panel INCa tumeurs solides 16 gènes (MiniSeq Illumina)

- Séquençage NGS : Panel TruSeq Amplicon Cancer 48 gènes (MiniSeq Illumina)

*Ces panels de gènes sont évolutifs (nature des gènes et techniques)

Interprétation:

La présence de certaines anomalies pathogéniques permet d'envisager la prescription de traitements ciblés correspondant. La pertinence des anomalies observées et la recherche des traitements ciblés adaptés sont discutées au CAL lors de la 2^{ème} RCP moléculaire.

Délai normal de rendu du résultat : 1 à 2 semaines.

Cotation Génotypage haut débit = BHN 1260 (N157, RIHN 2016)

Cotation Séquençage NGS entre BHN3270 et BHN 8170 selon le panel.

(Tsimberidou AM et al. Clin Cancer Res 2014)

Recherche des instabilités microsatellitaires (MSI)

Intérêt :

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

Prélèvement : L'analyse est réalisée à partir de 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 : 6 à 10 jours.

Cotation = BHN 600 (N500, RIHN 2016)

(*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 : La protéase uPA et son inhibiteur PAI1 sont produits 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, récepteurs aux estrogènes positifs et HER2 négatif, uPA et PAI1 sont un facteur pronostique du plus haut niveau de preuve (LOE-IA selon la grille de Hayes et Simon) qui aide à la décision thérapeutique (ASCO 2016, ESMO 2015, INCa 2013).

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, puis il peut être conservé indifféremment dans l'azote liquide ou à -80°C (< -70°C).
- Le prélèvement doit être contrôlé au plan anatomopathologique.
- Le prélèvement doit être réalisé en l'absence de bleu patenté dans le tissu tumoral, et à distance d'une biopsie ou cytoponction (au moins 15 jours après et à distance de la cicatrice).

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 : 6 à 10 jours (analyse réalisée de façon hebdomadaire).
Cotation = B300 (1825+1825+1826, nomenclature CCAM)

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

