



**Référentiel Régional de Prise en Charge**

**BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

**Actualisation Juillet 2011**

**Version 2**



# Groupe de Travail

---

<b>Animateurs</b>	Anne Gomez-Brouchet, H�el�ene Hounieu-Ritoux, Paul Caverivi�ere, Ghislaine Escourrou, Bernard Marques, Janick Selves, Pascal Wuithier
<b>Digestif</b>	<i>Janick Selves</i> , Rosine Guimbaud, Nicolas Carrere, Jean Pierre Duffas, Guillaume Portier,
<b>H�ematologie</b>	<i>Xavier Carles</i> , Eric Delabesse, Camille Laurent, Laurence Lamant, Jill Corre Daniel Schlaifer, V�eronique De Mas,
<b>Gyn�ecologie</b>	<i>Eliane Mery</i> , Laurence Gladieff, Ghislaine Escourrou, Pierre Leguevaque, Gwena�el Ferron, Martine Delannes,
<b>M�elanome</b>	<i>Laurence Lamant</i> , Christine Chevreau, Nicolas Meyer, Ignacio Garrido, Fr�ed�eric Lauwers, Rolland Viraben,
<b>Neurologie</b>	<i>Emmanuelle Uro-Coste</i> , Henri Roch�e, Alexandra Benouaich Amiel, Vincent Lubrano, Jean Sabatier, Elisabeth Moyal,
<b>ORL</b>	<i>B�eatrice Barres</i> , Jean Pierre Delord, Emmanuelle Uro Coste, J�er�ome Sarini, Michel Rives, S�ebastien Vergez,
<b>Pneumologie</b>	<i>Isabelle Rouquette</i> , Julien Mazi�eres, Laurence Bigay-Gam�e, Laurent Brouchet,
<b>Sarcome</b>	<i>Anne Gomez Brouchet</i> , Philippe Rochaix, Bernard Marques, Christine Chevreau, Paul Bonneville, J�er�ome Salles de Gauzy,
<b>S�enologie</b>	<i>Magali Lacroix Triki</i> , Ghislaine Escourrou, Henri Roch�e, Florence Dalenc, H�el�ene Charitansky,
<b>Thyro�ide</b>	<i>Isabelle Rouquette</i> , Philippe Caron, Claire Renaud, J�er�ome Sarini, Adil Benlyazid, Elie Serrano,
<b>Urologie</b>	<i>Catherine Mazerolles</i> , Lo�ic Mourey,
<b>Groupe Transversal</b>	Franck Burki, Etienne Chatelut, Etienne Suc, Marie-H�el�ene Gaspard, V�eronique Fabre
<b>M�ethodologie</b>	Karine Gordien

---

*"Cette proposition diagnostique et thérapeutique issue d'une discussion pluridisciplinaire au sein du réseau Oncomip n'est ni exclusive, ni contraignante, d'autres options (alors motivées) pouvant être envisagées individuellement; une révision au minimum annuelle de cette proposition permettra son actualisation ; toute proposition de modification peut à tout moment être adressée aux animateurs du groupe "Biologie Moléculaire" :*

Anne Brouchet	<a href="mailto:brouchet.anne@chu-toulouse.fr">brouchet.anne@chu-toulouse.fr</a>
Paul Caverivi�ere	<a href="mailto:paul.caveriviere@wanadoo.fr">paul.caveriviere@wanadoo.fr</a>
H�el�ene Hounieu-Ritoux	<a href="mailto:h.hounieu@ch-montauban.fr">h.hounieu@ch-montauban.fr</a>
Ghislaine Escourrou	<a href="mailto:escourrou.g@chu-toulouse.fr">escourrou.g@chu-toulouse.fr</a>
Janick Selves	<a href="mailto:selves.j@chu-toulouse.fr">selves.j@chu-toulouse.fr</a>
Pascal Wuithier	<a href="mailto:65acp@wanadoo.fr">65acp@wanadoo.fr</a>
Bernard Marques	<a href="mailto:marques.bernard@claudiusregaud.fr">marques.bernard@claudiusregaud.fr</a>
Karine Gordien	<a href="mailto:karine.gordien@oncomip.fr">karine.gordien@oncomip.fr</a>

# SOMMAIRE

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>PNEUMOLOGIE</b> .....	<b>6</b>
2.1	Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient.....	6
2.2	Examen de biologie moléculaire utile à la prise en charge du patient.....	7
<b>3</b>	<b>NEUROLOGIE</b> .....	<b>13</b>
3.1	Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient.....	13
3.2	Examen de biologie moléculaire utile à la prise en charge du patient.....	14
3.3	Texte intégral .....	14
<b>4</b>	<b>GYNÉCOLOGIE</b> .....	<b>16</b>
4.1	Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge des patientes porteuses de cancers de la vulve, du vagin, de l'utérus, des ovaires .....	16
4.2	Examen de biologie moléculaire utile à la prise en charge du patient.....	16
<b>5</b>	<b>SÉNOLOGIE</b> .....	<b>18</b>
5.1	Arbre décisionnel Statut HER2 .....	18
5.2	Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient.....	19
5.3	Examens de biologie moléculaire utiles à la prise en charge du patient .....	20
<b>6</b>	<b>SARCOMES</b> .....	<b>21</b>
6.1	Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient.....	21
6.2	Examens moléculaires réalisés à l'Institut Bergonié.....	21
6.3	Examens moléculaires réalisés à l'Institut Claudius Regaud .....	23
6.4	Examens moléculaires réalisés au CHU Toulouse .....	24
<b>7</b>	<b>PATHOLOGIE DIGESTIVE</b> .....	<b>25</b>
7.1	Cancer colo-rectal.....	25
7.2	GIST .....	30
7.3	Cancers gastriques .....	31
7.4	Cancers œsophage, canal anal .....	33
7.5	Cancer du foie.....	33
7.6	Tumeur bénigne du foie.....	33
7.7	Cancer du pancréas .....	33
7.8	Tumeurs endocrines.....	33
7.9	Lymphomes digestifs :.....	33
7.10	Sarcomes (autres que GIST) :.....	33
<b>8</b>	<b>ORL</b> .....	<b>34</b>
<b>9</b>	<b>MELANOME</b> .....	<b>35</b>
<b>10</b>	<b>THYROÏDE</b> .....	<b>38</b>
<b>11</b>	<b>UROLOGIE</b> .....	<b>39</b>
<b>12</b>	<b>HEMATOLOGIE</b> .....	<b>40</b>
12.1	Syndromes Myéloprolifératifs .....	40
12.2	La leucémie lymphoïde chronique (LLC) .....	43
12.3	Leucémies aiguës.....	44
12.4	Syndromes lymphoprolifératifs .....	46
<b>13</b>	<b>Tableau récapitulatif des examens de biologie moléculaire indispensables et utiles à la prise en charge des patients</b> .....	<b>48</b>
13.1	Examens indispensables .....	48
13.2	Examens utiles.....	51



## 1 INTRODUCTION

---

Les modifications génomiques responsables de la carcinogenèse peuvent intéresser soit un gène (par exemple les mutations ou les méthylations de promoteurs) soit des portions entières de chromosome (translocation, inversion, délétion, amplification).

### ➤ Les anomalies des gènes

#### Les mutations

Ce sont des anomalies de la séquence génomique portant sur une ou plusieurs bases d'un gène.

- **Méthodes par extraction des acides nucléiques**

Leur mise en évidence fait appel à des techniques de biologie moléculaire nécessitant l'extraction d'ADN ou d'ARN du tissu tumoral.

Pour certains gènes, comme le gène K-ras, les mutations intéressent toujours les mêmes bases. L'étude de la séquence génomique porte sur cette petite portion du gène et il n'est pas nécessaire d'obtenir des ARN ou des ADN de très grande taille. Pour d'autres gènes (C-KIT, EGF-R, P53...), les mutations peuvent se situer à de multiples endroits dans le gène. L'étude de la séquence génomique porte alors sur des portions étendues du gène et nécessite une meilleure qualité des acides nucléiques.

La **fixation au formol** permet en théorie l'extraction de fragments de 200 à 300 paires de bases, permettant la recherche de mutation à partir de tissus fixés et inclus en paraffine. Néanmoins, la taille des fragments extraits est parfois beaucoup plus petite, surtout en cas de sous ou de sur-fixation. Enfin, le formol peut gêner lors des étapes de PCR et être responsable d'erreurs de séquençage.

Pour la recherche de mutation, la meilleure préservation tissulaire est incontestablement **la congélation** qui permet l'obtention d'acides nucléiques de très grande taille et de très bonne qualité.

- **Méthodes in situ**

Il n'existe pas à l'heure actuelle de techniques *in situ* fiables permettant d'étudier les mutations des gènes.

### ➤ Les anomalies de structures chromosomiques

#### Les translocations

La mise bout à bout de deux fragments de chromosomes différents conduit à la formation d'un gène anormal dont le début correspond à une partie du gène porté par le premier chromosome et la fin correspond à une partie du gène porté par le second chromosome. On parle de gène de fusion. Parfois ces gènes de fusion codent pour une protéine hybride ayant une activité oncogène.

- **Méthodes par extraction des acides nucléiques**

Ces anomalies peuvent être étudiées après extraction des ARN messagers par recherche de *transcrits de fusion* (ARNm anormaux codés par le gène de fusion). On réalise une RT-PCR (transformation des ARNm en ADNc puis amplification par PCR classique) dont une des deux amorces est située sur le premier gène et la seconde amorce est située sur le second gène. Dans les conditions normales, il n'y a pas d'amplification puisque les deux amorces ne s'hybrident pas sur le même fragment d'ADNc (les deux gènes codent des ARNm différents). En cas de translocation, les deux amorces s'hybrideront sur le même ADNc et il y aura amplification.

La **fixation au formol** permet en théorie l'extraction d'une petite fraction des ARNm et la sensibilité de la technique permet de détecter les transcrits de fusion. Néanmoins, la sous ou la sur fixation peuvent rendre impossible l'extraction des ARNm.

Ici encore, la meilleure préservation tissulaire est incontestablement **la congélation** qui permet l'obtention d'acides nucléiques de très grande taille et de très bonne qualité.



- **Méthodes in situ**

Ces anomalies peuvent également être étudiées par technique *in situ* de type FISH.

La technique FISH va consister en l'utilisation de deux sondes chromosomiques fluorescentes de couleur différente, par exemple l'une rouge l'autre verte. Elles reconnaissent des régions chromosomiques placées de part et d'autre des points de cassure et permettent la mise en évidence sur coupes tissulaires de la cassure du chromosome et de la fusion des deux chromosomes anormaux.

➤ **Amplification/délétion génique**

Une cellule normale comporte deux exemplaires de chaque chromosome et donc deux exemplaires de chaque gène (en dehors des gènes des chromosomes X et Y chez l'homme). On observe dans certains types tumoraux des anomalies de nombre de copie de certains gènes. Ceci peut correspondre soit à une amplification (augmentation du nombre de copies du gène sur un chromosome), soit à une délétion (perte d'une partie d'un chromosome) soit à une aneuploïdie (anomalie du nombre de chromosomes).

- **Méthodes par extraction des acides nucléiques**

Des techniques de Q-PCR peuvent être utilisées : elles consistent à extraire l'ADN des cellules et à quantifier par une technique de PCR quantitative (Q-PCR) le nombre de copies du gène d'intérêt (par exemple MDM2) par rapport à un gène de référence. Cette technique, très précise, permet, d'apprécier la quantité de copies du gène présente initialement dans l'ADN. Cette technique présente l'inconvénient de nécessiter l'extraction d'ADN, et de mélanger cellules tumorales et cellules réactionnelles, ce qui peut fausser les mesures.

- **Méthodes in situ**

Ces anomalies peuvent être mises en évidence par des techniques d'hybridation *in situ* de type FISH, CISH voire SISH ; il suffit de posséder une sonde marquée se fixant dans la région chromosomique du gène d'intérêt ; il doit normalement y avoir deux copies du gène dans le noyau de la cellule ; si on en observe plus de deux ou moins de deux, c'est qu'il y a un nombre anormal de copies du gène.

La différence entre amplification/délétion et aneuploïdie peut être mise en évidence en utilisant une seconde sonde hybridant le centromère du chromosome : on peut ainsi étudier le nombre de copies du gène par rapport au nombre de copies du chromosome d'intérêt.

Ces amplifications sont particulièrement utiles dans le diagnostic des liposarcomes bien différenciés pour lesquels il existe une amplification des gènes MDM2 et CDK4. Cette dernière s'accompagne d'une surexpression de la protéine dans les formes dédifférenciées que l'on détecte par immunohistochimie. Cependant, cette surexpression protéique est fréquemment faible voire absente dans les liposarcomes bien différenciés, et seules les techniques de FISH permettent d'affirmer l'amplification du gène et donc le diagnostic.

Pour les anomalies de type amplification/délétion, les techniques FISH semblent à l'heure actuelle de maniement plus aisé et sont réalisables sur tout type de tissu à l'exception de ceux fixés avec de l'acide picrique.



## ✘ 2 PNEUMOLOGIE

---

### 2.1 Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient

*La caractérisation moléculaire de la tumeur doit permettre un accès optimal aux thérapies ciblées.*

#### 2.1.1 Les mutations du gène EGFR :

On sait depuis 2004 que la présence d'une mutation activatrice du gène EGFR est un facteur prédictif de réponse aux Inhibiteurs de Tyrosine Kinase de l'EGFR.

Ces mutations, plus fréquentes dans l'adénocarcinome, chez les femmes, les non fumeurs et les asiatiques, intéressent à 90% les exons suivants:

- l'exon 19 (délétions),
- l'exon 21 (mutation ponctuelle L858R, plus rarement L861Q),
- moins fréquente l'exon 18 (G719S, G719A et G719C),
- une mutation de résistance T790M est décrite, elle porte sur l'exon 20 et peut être présente d'emblée ou apparaître au cours du traitement.

#### 2.1.2 Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) d'EGFR :

- L'ERLOTINIB (TARCEVA<sup>®</sup>) a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2005 en seconde ligne et il n'était pas nécessaire, dans cette indication, de déterminer le statut mutationnel pour le prescrire. Une autre AMM a été accordée en 2010 pour les patients porteurs de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) stables après 4 cycles de chimiothérapie en situation de maintenance indépendamment du type histologique et du statut mutationnel.
- Le GEFITINIB (IRESSA<sup>®</sup>) a obtenu, en 2010, l'AMM en première ligne à la suite de l'essai IPASS mené en Asie. Il a montré le bénéfice, en première ligne, de la monothérapie par Iressa versus un doublet de chimiothérapie à base de platine sur la survie sans progression des patients mutés. Ces données ont été confirmées par deux essais de phase III récents (Mitsudomi et Maemondo).

*Le choix de la thérapie adjuvante en première ligne chez les patients à un stade avancé IIIB ou IV dépend donc aujourd'hui de la recherche des mutations.*

#### 2.1.3 La recherche de mutation :

- Les indications :

**Type de tumeur testé :** Les préconisations actuelles sont de rechercher les mutations sur les **adénocarcinomes** et les **carcinomes non épidermoïdes**. Les épidermoïdes du fumeur n'entrent pas dans ces indications pour le moment. Dans certains cas, comme les épidermoïdes des non fumeurs, des femmes, des sujets jeunes, la recherche pourra être effectuée après discussion préalable avec le clinicien.

**Stades :** **stades IIIB ou IV**, ou bien tous les stades si le patient n'est **pas opérable**. On ne teste pas le statut mutationnel sur une pièce opératoire récente de stade I à IIIA.

- Le matériel :

Cette recherche se fait donc le plus souvent sur matériel biopsique (biopsies bronchiques, biopsies sous scanner, biopsie de site métastatique). En cas de rechute, si le patient n'est pas rebiopsié, on pourra faire la recherche sur la pièce initiale.

- La conservation du matériel :

**L'idéal :** Tissu congelé ou Fixation en formol tamponné avec une durée de fixation idéalement inférieure à 24 heures.



**A proscrire** : Le Bouin et les fixateurs renfermant de l'acide picrique ou des dérivés mercuriels

**A éviter** : certains AFA trop acides.

**Autres** : fixateurs en cours d'évaluation (finefix, RCL2,...) peuvent être utilisés mais ne sont pas des standards.

✱ **2.1.4 L'organisation sur la plateforme : voir le détail dans la rubrique génotypage des cancers bronchiques sur le site d'Oncomip dans [l'espace professionnel](#).**

<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Mutations exons 18 à 21 d'EGFR</b>
<b>BUT</b>	Prescription gefitinib (Iressa) en première ligne Chez les patients porteurs d'un carcinome bronchique non à petites cellules localement avancé ou métastatique avec mutations activatrices d'EGFR. (AMM européenne juin 2009, AMM France février 2010)
<b>Technique</b>	HRM/séquençage
<b>Modalités de prélèvement</b>	Idéal : tissu congelé
<b>Modalités de fixation</b>	Si congélation non faite fixation en formol tamponné avec une durée de fixation idéalement inférieure à 24H. Proscrire bouin et les fixateurs renfermant de l'acide picrique ou des dérivés mercuriels, éviter AFA trop acide. Les fixateurs en cours d'évaluation peuvent être utilisés mais ne sont pas des standards.
<b>Médecin responsable</b>	Dr ROUQUETTE Isabelle Service Anatomie Pathologique CHU Rangueil 1 av Jean Poulhès TSA 50032 31059 TOULOUSE cedex
<b>Délai de réponse</b>	9 jours en moyenne depuis Janvier 2011 (renforcement plateforme projet ORPAMIP et financement INCa pour les adénocarcinomes)

✱ **2.2 Examen de biologie moléculaire utile à la prise en charge du patient**

**2.2.1 Les mutations recherchées**

Anomalie moléculaire	<b>Mutations exons 18 à 21 d'EGFR</b>
BUT	Facteurs prédictifs de réponse, sélection des patients et adaptation du traitement.
Indication	Cancers du poumon stades avancés ou métastatiques en deuxième ligne maintenance ou première ligne si chimiothérapie impossible.
Technique	HRM et/ou séquençage
Modalités de prélèvement	Si possible congeler du matériel tissulaire
Modalités de fixation	Dans l'idéal, congélation Si fixation, l'idéal est le formol. Proscrire bouin et dubosq
Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen	Dr ROUQUETTE Isabelle Service Anatomie Pathologique CHU Rangueil 1 av Jean Poulhès TSA 50032 31059 TOULOUSE cedex
Délai de réponse	9 jours en moyenne depuis Janvier 2011 (renforcement plateforme projet ORPAMIP et financement INCa pour les adénocarcinomes)



## 2.2.2 Les nouveaux biomarqueurs ❁

### LES NOUVEAUX BIOMARQUEURS

Le document de référence de l'INCa est téléchargeable sur le site : [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)

Au-delà des mutations de l'EGFR, les données de la littérature ont identifié plusieurs altérations moléculaires dans le cancer du poumon non à petites cellules.

Certaines d'entre elles sont relativement fréquentes, comme les mutations du **gène KRAS** (Cf. figure 1 : environ 20 % des patients), d'autres sont plus rares, comme la **translocation d'EML4-ALK** ou les **mutations de HER2** qui concernent moins de 5 % des patients. La plupart de ces mutations sont **mutuellement exclusives** (Cf. figure 2).

KRAS mutation		Incidence (%) <sup>*</sup>
Amino acid substitution	Nucleotide substitution	
<i>Codon 12 mutations</i>		
Aspartate (G12D)	G35A	32.5
Valine (G12V)	G35T	22.5
Cysteine (G12C)	G34T	8.8
Serine (G12S)	G34A	7.6
Alanine (G12A)	G35C	6.4
Arginine (G12R)	G34C	0.9
<i>Codon 13 mutation</i>		
Aspartate (G13D)	G38A	19.5
<i>Other mutations<sup>‡</sup></i>		
		1.8

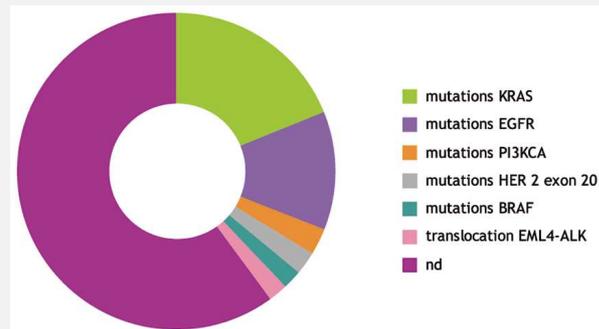


Figure 1 : Description des mutations du gène KRAS

Figure 2 : Classification moléculaire des cancers du poumon non à petites cellules

Au final, une altération moléculaire peut être identifiée chez environ **40 % des patients** atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules. Plusieurs molécules ciblant ces altérations moléculaires sont déjà en phase clinique, certaines d'entre elles étant déjà en phase III (cf. tableau ci-dessous).

CANCER DU POUMON				
Biomarqueur	Fonction du biomarqueur	Molécule	Activité de la molécule	Essais cliniques en cours
Mutations - activatrices de l'EGFR	Cible moléculaire	Gefitinib	Inhibiteurs réversibles de l'EGFR	AMM
		Erlotinib	Inhibiteur irréversible de l'EGFR et de HER2	Phase II : NCT00525148 Phase III : NCT00949650
		BIBW 2992	Inhibiteur irréversible de l'EGFR et de HER2	Phase III : NCT01000025 Phase II : NCT00548093
- de résistance primaire de l'EGFR	Cible moléculaire + [Résistance TKI-EGFR]	PF00299804/PF299	Inhibiteur irréversible de l'EGFR et de HER2	Phase III : NCT01000025 Phase II : NCT00548093
		BIBW 2992	Inhibiteur irréversible de l'EGFR et de HER2	Phase II : NCT00525148 Phase III : NCT00949650
Mutations dans l'exon 20 de HER2	Cible moléculaire + [Résistance TKI-EGFR]	BIBW 2992	Inhibiteur irréversible de l'EGFR et de HER2	Phase II : NCT00730925
Translocations EML4-ALK <sup>7</sup>	Cible moléculaire + [Résistance TKI-EGFR]	PF-02341066	Double inhibiteur MET/ALK	Phase III : NCT00932893 Phase II : NCT00932451
Mutations KRAS	Prédictif de la réponse + [Résistance TKI-EGFR et TKI EGFR irréversibles]	AZD6244/ARRY-142886	Inhibiteur de MEK	Phase II : NCT00890825
		GSK1120212	Inhibiteur de MEK	Phase I : NCT00955773
		Ridaforolimus (AP 23573, Deforolimus)	Inhibiteur de mTOR	Phase II : NCT00818675



Biomarqueur	Fonction du biomarqueur	Molécule	Activité de la molécule	Essais cliniques en cours
Mutation de BRAF : V600E	Cible moléculaire	AZD6244/ ARRY-142886	Inhibiteur de MEK	Phase II : NCT00888134
Mutations de PIK3CA	Cible moléculaire	NVP-BEZ235	Inhibiteur PI3K/mTOR	Phase I/II : NCT00620594 recherche du statut mutationnel pour les patients inclus

La recherche de ces altérations moléculaires par les plateformes de génétique moléculaire ne se fait pas sans difficultés liées à la **validation** de la technique utilisée mais aussi aux contraintes de la **qualité du prélèvement** et de la **quantité** de matériel disponible. Elle doit se faire dans des conditions **d'assurance qualité** optimisées, tout en assurant un **délai de rendu des résultats** compatible avec la prise en charge clinique.

La détermination d'un panel de biomarqueurs, utilisant parfois des techniques différentes, va augmenter la difficulté de réalisation et va rendre plus critique la gestion des petits prélèvements (en particulier pour le cancer du poumon). Afin d'anticiper l'arrivée de ces nouvelles molécules et de les rendre disponibles le plus rapidement possible, l'INCa met en place un programme de détection prospective de ces biomarqueurs émergents dans le cancer du poumon. Il s'agit, pour les 10 000 patients atteints d'un adénocarcinome du poumon chez lesquels la mutation de l'EGFR doit être cherchée chaque année, de rechercher aussi les mutations des gènes KRAS, BRAF, PI3KCA et HER2, ainsi que la translocation du gène EML4-ALK.

### 2.2.2 La recherche de mutation : ❄

- Les indications :

**Type de tumeur testé :** Les préconisations actuelles sont de rechercher ces mutations sur les adénocarcinomes.

**Stades :** stades IIIB ou IV, ou bien tous les stades si le patient n'est pas opérable. On ne teste pas le statut mutationnel sur une pièce opératoire récente de stade I à IIIA.

- Cas particulier de la translocation EML4-ALK :

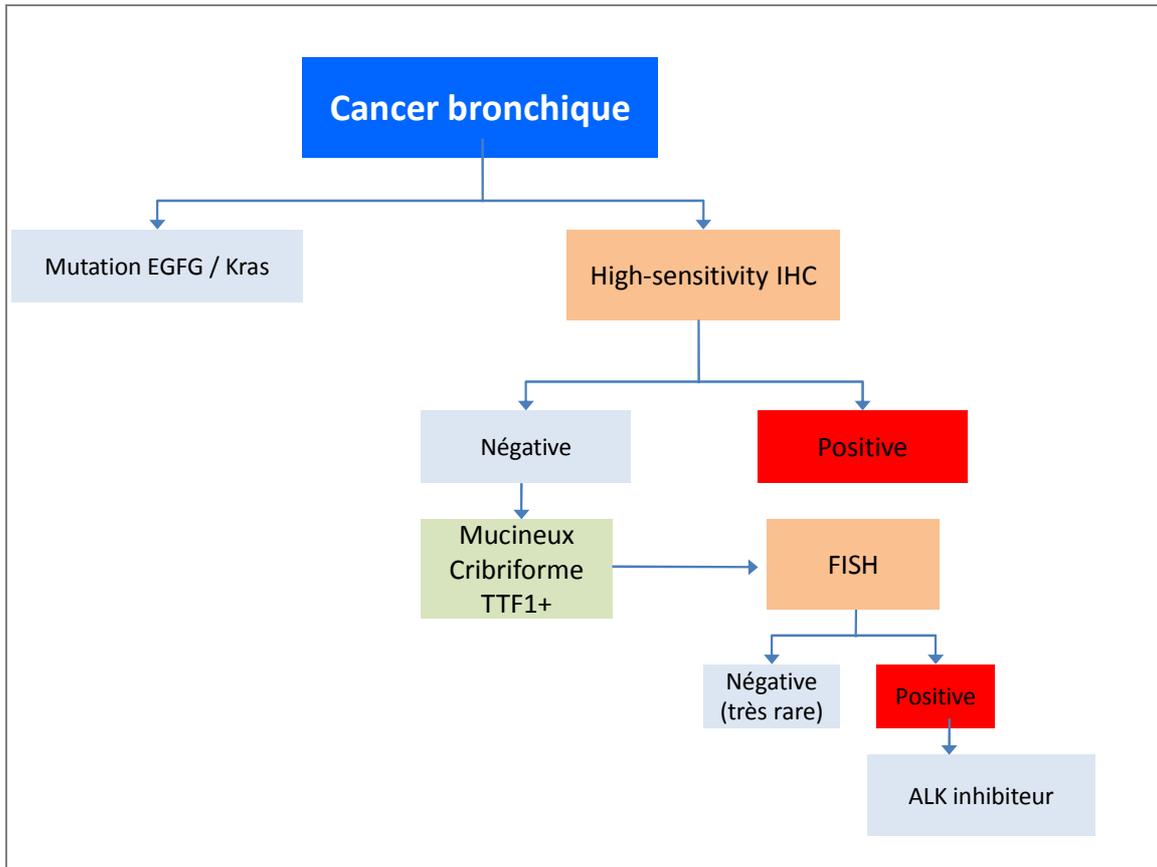
Une autre voie, associée à une anomalie moléculaire motrice, a été récemment mise en évidence : il s'agit de la translocation EML4-ALK. Des inversions chromosomiques se produisent dans 5% à 7% des cancers bronchiques et aboutissent à la formation d'un gène de fusion entre le domaine actif de la kinase ALK1 et EML4 ce qui est responsable d'une activation constitutionnelle de la kinase ALK dont le rôle sur la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose est bien connu. Un inhibiteur de c-Met qui s'est ensuite révélé être un inhibiteur puissant de ALK-EML4 a été testé.

Dans une première étude, 90% des patients porteurs de l'anomalie, traités avec du crizotinib ont répondu positivement au traitement et plus de la moitié (57%) ont vu leur tumeur régresser après huit semaines. Deux études de phase III sont actuellement en cours. Une étude rapportée au dernier congrès de l'ASCO a comparé la survie des patients avec réarrangement EML4-ALK traités ou non par crizotinib avec celle des patients souffrant d'un adénocarcinome sans réarrangement EML4-ALK ni mutation EGFR. Le réarrangement EML4-ALK n'a pas un rôle pronostique mais la survie des patients traités paraît supérieure à celle des non traités (J Clin Oncol 29: 2011 suppl.; [abstr 7507](#) by A.Tsang-Shaw) « Impact of crizotinib on survival in patients with advanced, ALK-positive NSCLC compared with historical controls ».

Un point clef concerne la technique utilisée. La technique de référence est la FISH. Néanmoins l'IHC apparaît désormais comme un test fiable, fortement corrélé aux résultats en FISH, aisément réalisable et sur petits échantillons de tissu, décrite par Mitsudomi et al. à l'ASCO 2011 [J Clin Oncol 29: 2011



(suppl; [abstr 7534](#))]. Nous proposons un nouvel algorithme basé sur ces données (Figure ci-dessous : recherche de la translocation EML4-ALK).



✱ **Figure :** Proposition d'algorithme pour la recherche de la translocation EML4-ALK

La translocation ALK a le plus souvent été rapportée dans les adénocarcinomes bronchiques, de type mucineux, chez des patients jeunes, sans influence apparente du tabac (ce qui n'exclut donc pas les fumeurs), ne répondant pas aux traitements anti-EGFR et répondant comme les patients n'ayant pas d'anomalies de ALK aux chimiothérapies conventionnelles. Camidge *et al.* ont récemment proposé de sélectionner les patients sur 2 critères : non ou peu fumeurs et WT pour EGFR et K-Ras ; 45 % des patients ainsi sélectionnés sont porteurs de la translocation EML4-ALK.

- Le matériel :

Cette recherche se fait donc le plus souvent sur du matériel biopsique (biopsies bronchiques, biopsies sous scanner, biopsie de site métastatique).

En cas de rechute, si le patient n'est pas re-biopsié, on pourra faire la recherche sur la pièce initiale. Lorsque le patient a déjà eu une recherche de mutation EGFR et si la plateforme a gardé de l'ADN en quantité suffisante et de bonne qualité, elle pourra rechercher les autres mutations (KRAS, BRAF, HER2, PI3K) sur ce même ADN.

La translocation EML4-ALK est recherchée par FISH (hybridation in situ en Immunofluorescence). Pour cela, la plateforme doit donc disposer d'un bloc représentatif de la tumeur : si le matériel initial est épuisé, il conviendra de discuter avec le clinicien de l'opportunité de re-biopsier le patient.



- La conservation du matériel :

**L'idéal :** Tissu congelé ou Fixation en formol tamponné avec une durée de fixation idéalement inférieure à 24 heures. Pour la FISH attention à l'éosine utilisée dans les blocs pour repérer les petites biopsies qui gêne la recherche du split signal en raison de l'auto-fluorescence de ce colorant.

**A proscrire :** Le Bouin et les fixateurs renfermant de l'acide picrique ou des dérivés mercuriels.

**A éviter :** certains AFA trop acides.

**Autres :** fixateurs en cours d'évaluation (finefix, RCL2,...) peuvent être utilisés mais ne sont pas des standards.

### 2.2.3 *L'organisation sur la plateforme : voir le détail dans la rubrique « génotypage des cancers bronchiques » sur le site d'Oncomip dans [l'espace professionnel](#).*

Pour ce qui concerne les bio-marqueurs, l'organisation est la même que pour EGFR à deux exceptions près :

- PI3KCA dont les mutations sont recherchées dans le Service du Pr Favre à l'ICR : le principe du circuit reste le même avec prescription au pathologiste qui transfèrera le prélèvement, son compte-rendu et la fiche à l'ICR en précisant qu'il souhaite rechercher spécifiquement ces mutations.

**Institut Claudius Regaud**  
Département d'Oncogénétique  
20-24, Rue du Pont Saint-Pierre  
31052 Toulouse Cedex

Contact : [Pr Gilles Favre](#)  
Secrétariat : 05 61 42 42 23

- Remboursement du déstockage : l'INCa ne prévoit pas de remboursement du déstockage pour les nouveaux biomarqueurs, estimant que celui-ci est déjà remboursé lors de la demande d'EGFR.

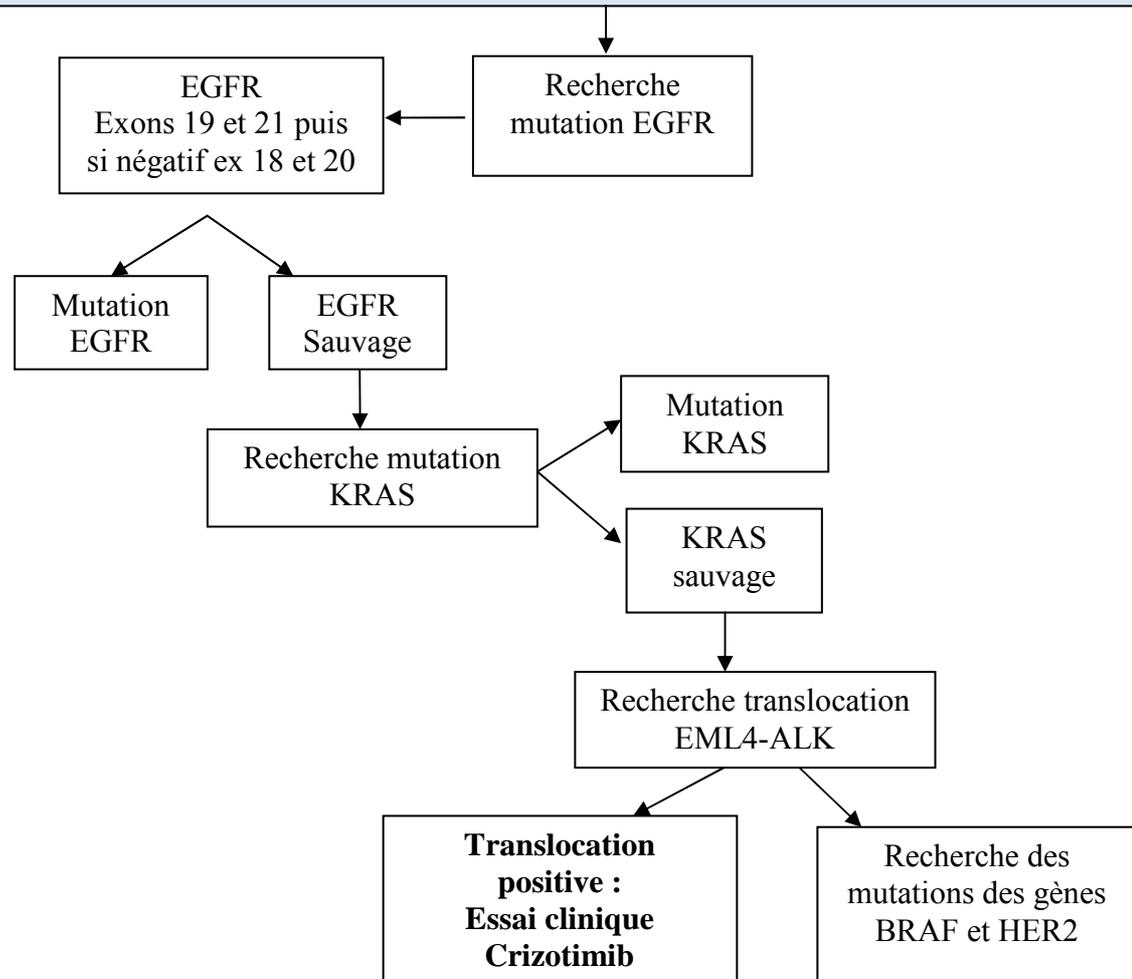


## Arbre diagnostique des adénocarcinomes et des carcinomes non à petites cellules :

**Adénocarcinome et carcinome du poumon non à petites cellules** de stade pTNM IIIB ou IV et tous les stades pour les patients non opérables:

Possibilité après discussion avec le clinicien, d'effectuer la recherche dans certains cas :

- 1) épidermoïdes des non fumeurs    2) femmes    3) des sujets jeunes





### 3 NEUROLOGIE

#### 3.1 Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient

##### \* 3.1.1 Recherche de la co-délétion 1p19q

- sur fragment congelé

Anomalie moléculaire	Recherche de la co-délétion 1p19q
<b>BUT</b>	Identifier un groupe de tumeurs cérébrales ayant un pronostic favorable
<b>Indication</b>	Toute tumeur gliale avec un possible contingent oligodendrogial
<b>Technique</b>	LOH (recherche de la perte d'hétérozygotie)
<b>Modalités de prélèvement</b>	- Un fragment tumoral congelé - Un prélèvement sanguin sur Buvard FTA Whatman *
<b>Modalités de fixation</b>	Fragment congelé (protocole mis en place par la tumorothèque régionale)
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Dr Emmanuelle Uro-Coste Service d'Anatomie Pathologique CHU Toulouse-Rangueil
<b>Délai de réponse</b>	En moyenne 10 jours et jusqu' à 1 mois

\* : se procurer des buvards Whatman adaptés (références disponibles auprès de la surveillante du service d'anatomie pathologique de Rangueil et de Karine Gordien, ONCOMIP, chargée de la coordination de la tumorothèque régionale) et imbiber de sang la zone indiquée (un cercle d'environ 3 cm de diamètre). Laisser sécher à l'air, identifier le buvard avec l'identification du patient, mettre dans une enveloppe et faire parvenir à la tumorothèque régionale avec le fragment congelé.

- sur coupes en paraffine

Anomalie moléculaire	Recherche de la co-délétion 1p19q
<b>BUT</b>	Identifier un groupe de tumeurs cérébrales ayant un pronostic favorable
<b>Indication</b>	Toute tumeur gliale avec un possible contingent oligodendrogial
<b>Technique</b>	FISH avec les sondes Vysis
<b>Modalités de prélèvement</b>	Fixation et inclusion en paraffine : fournir le bloc en paraffine et la lame colorée correspondante sur laquelle la zone d'intérêt est entourée au feutre dans un cercle de 5 mm de diamètre au maximum.
<b>Modalités de fixation</b>	Eviter une fixation prolongée >48h
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Dr Emmanuelle Uro-Coste Service d'Anatomie Pathologique CHU Toulouse-Rangueil
<b>Délai de réponse</b>	En moyenne 10 jours et jusqu'à 1 mois



## 3.2 Examen de biologie moléculaire utile à la prise en charge du patient

### 3.2.1 Evaluation de la méthylation du promoteur du gène MGMT (Methyl Guanine Méthyl Transférase)

<b>Anomalie moléculaire</b>	Méthylation du gène MGMT
<b>BUT</b>	Délimitation d'un groupe de patient à réponse thérapeutique favorable
<b>Indication</b>	Glioblastomes
<b>Technique</b>	Méthyl Spécifique PCR et Méthyl Spécifique HRM
<b>Modalités de prélèvement</b>	Fragment tumoral congelé ou bloc en paraffine
<b>Modalités de fixation</b>	Eviter formol zinc si fixation
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Dr Emmanuelle Uro-Coste Service d'Anatomie Pathologique CHU Toulouse-Rangueil
<b>Délai de réponse</b>	1 semaine en moyenne, maximum 15 jours

## \* 3.3 Texte intégral

*Intégration de nouvelles données de type moléculaire dans le diagnostic et dans l'évaluation de la réponse thérapeutique.*

### 3.3.1 Une recherche de la co-délétion 1p19q peut s'avérer utile dans plusieurs cas :

- devant un oligodendrogliome typique pour distinguer dans ce groupe les tumeurs porteuses de la délétion 1p19q qui ont un meilleur pronostic global.
- devant un gliome ayant un contingent oligodendrogliol ou une inflexion morphologique oligodendrogliale incomplète. La présence de la co-délétion 1p19q permet d'affirmer formellement le diagnostic d'oligodendrogliome.  
En revanche, son absence ne permet pas d'éliminer le diagnostic d'oligodendrogliome.

Deux techniques sont disponibles pour la recherche de cette perte chromosomique :

- la technique FISH sur coupe en paraffine, coupes au cryostat ou appositions.
- une technique par PCR, la LOH, qui nécessite la comparaison de l'ADN tumoral avec l'ADN du sang du patient. Cette technique est disponible au CHU et pour les établissements extérieurs dans le cadre de la [tumorothèque régionale ONCOMIP](#) (voir dispositif prévu dans l'annexe de fonctionnement de la tumorothèque régionale et sur le site ONCOMIP).



### 3.3.2 *La méthylation du promoteur du gène MGMT (Methyl Guanine Methyl Transférase)*

La méthylation du promoteur du gène *MGMT* est également un facteur pronostique intéressant, en particulier dans les gliomes de haut grade. Cependant, en dehors d'essais cliniques, elle n'est pas utilisée pour orienter la thérapeutique.

Les tumeurs méthylées sont statistiquement associées à un meilleur pronostic, mais il existe une importante variabilité à l'échelon individuel. Cette technique est disponible au CHU et pour les établissements extérieurs dans le cadre de la tumorothèque régionale ONCOMIP (voir dispositif prévu dans l'annexe de fonctionnement de la [tumorothèque régionale](#) et sur le site ONCOMIP).

### 3.3.3 *D'autres examens*

- Les mutations ponctuelles dans les gènes IDH1 et IDH2 sont associées à des gliomes de meilleur pronostic. Un anticorps commercial a été conçu pour marquer spécifiquement la protéine mutante IDH1 avec mutation R132H. Cette mutation IDH1R132H est très largement majoritaire : elle est retrouvée dans la grande majorité des gliomes de bas grade. La présence d'une mutation IDH1 ou IDH2 dans un glioblastome indique un meilleur pronostic. Les mutations minoritaires d'IDH1 et IDH2 peuvent être recherchées par biologie moléculaire. Cette technique n'est pas encore de pratique courante.
- Pour les médulloblastomes, la recherche d'une amplification de c-MYC et N-MYC émerge actuellement comme un facteur pronostique péjoratif entraînant une intensification thérapeutique dans le cadre d'essais cliniques. Ces examens sont réalisés à l'Institut Curie à Paris par l'équipe du [Dr Olivier Delattre](#).

**Institut Curie**  
26 Rue d'Ulm  
75005 Paris  
Tel : 01 56 24 55 00

**Unité de génétique somatique**  
Contact : Dr Olivier Delattre



## 4 GYNÉCOLOGIE

---

### 4.1 Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge des patientes porteuses de cancers de la vulve, du vagin, de l'utérus, des ovaires

Il n'existe pas à ce jour d'indication d'examen de biologie moléculaire indispensable au diagnostic, ou à la thérapeutique.

### 4.2 Examen de biologie moléculaire utile à la prise en charge du patient

#### 4.2.1 COL : Virus HPV

La recherche du virus HPV est utile à la prise en charge du patient et se fait sur prélèvement cytologique en milieu liquide ou sur milieu dédié.

La technique est disponible en Midi Pyrénées dans les centres spécialisés (CHU Toulouse) ainsi que dans certains laboratoires et cabinet de pathologie privés.

<b>But</b>	Mise en évidence de la présence d'un virus HPV
<b>Technique</b>	HIS / PCR HPV/ Hybrid capture
<b>Indication</b>	Utile diagnostique si présence d'ASC-US sur le frottis cervico-utérin (recommandation HAS)
<b>Modalités de prélèvement</b>	Frottis en milieu liquide ou prélèvement en milieu dédié
<b>Modalités de fixation</b>	Fixation dans le liquide fixateur fourni par l'industriel (frottis en milieu liquide) Ou conservation dans un milieu dédié

#### 4.2.2 Cancer de l'endomètre chez des patientes présentant le syndrome de lynch

Il n'existe à l'heure actuelle aucune recommandation à la recherche d'une instabilité micro satellitaire dans le cadre d'un syndrome de Lynch.

Cette recherche est utile (accord d'experts) chez les patientes de moins de 50 ans ou ayant des antécédents personnels ou familial au premier degré d'un cancer colorectal.

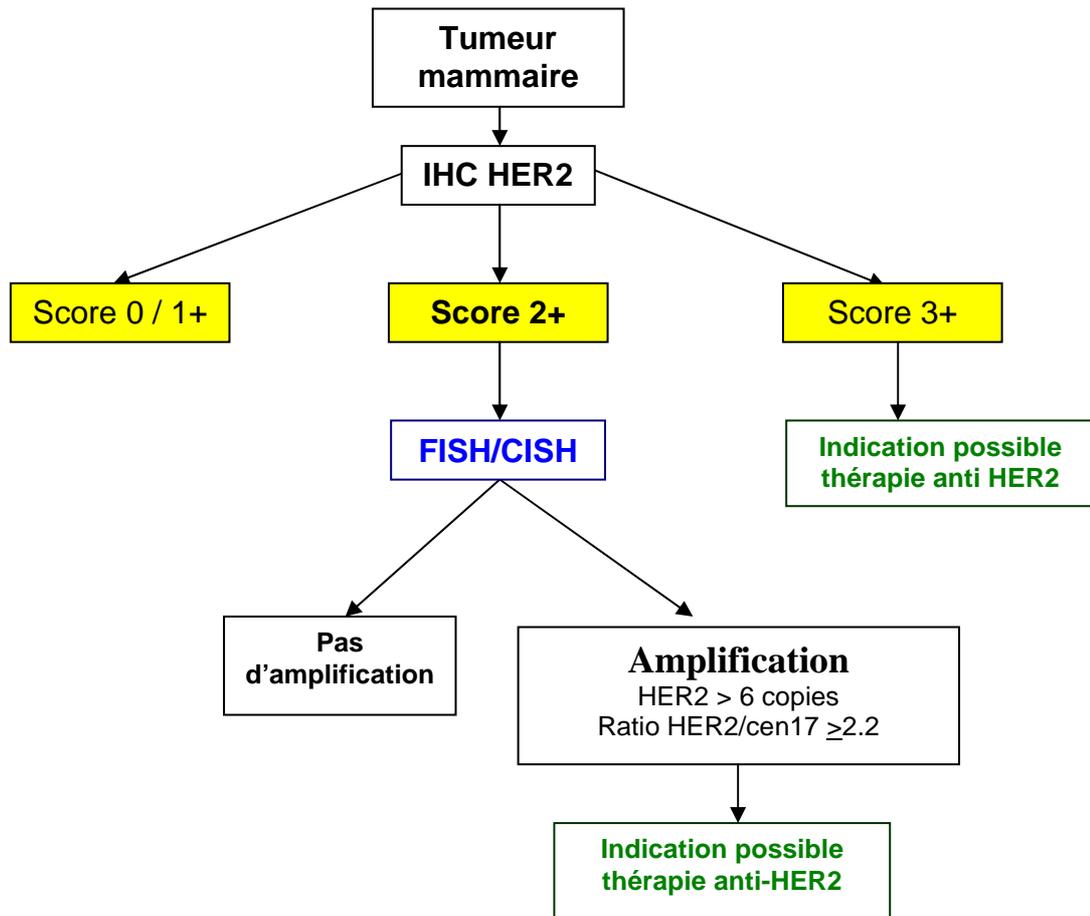


<b>Anomalie moléculaire</b>	Instabilité micro satellitaire dans les cancers colo-rectaux et endométriaux (ou autres cancers du spectre HNPCC)	
<b>BUT</b>	<b>Sélection de patientes</b> susceptibles d'être porteuses d'un syndrome HNPCC	
<b>Indication</b>	<b>Utile et recommandée</b>	<b>Marqueur diagnostique</b> : identifier les patients porteurs d'un syndrome HNPCC par une stratégie en deux étapes : 1/ Test RER (instabilité microsatellitaire +/- immunohistochimie) pour les patientes avec un cancer endométrial: <ul style="list-style-type: none"><li>- Agés de moins de 50 ans</li><li>- ou avec un antécédent personnel ou familial au premier degré de cancer colorectal ou de cancer de l'endomètre ou de cancer de l'intestin grêle ou de cancer urothélial (vessie exclue).</li></ul> 2/ Avis oncogénétique spécialisé pour toutes les patientes avec test RER positif
<b>Technique (MSI)</b>	1 / extraction ADN de la tumeur (avec macrodissection de la zone la plus riche en cellules tumorales) 2/ amplification de 5 séquences microsatellitaires par PCR pentaplex 3/ génotypage de ces séquences microsatellites (instabilité microsatellitaire ou MSI si au moins 2 microsatellites instables sur cinq).  En complément de la recherche d'instabilité microsatellitaire ou pour les cas avec très peu de cellules tumorales ou fixateur ne permettant pas d'étude en biologie moléculaire avec les 4 anticorps : anti-MLH1, anti-MSH2, anti-MSH6 et anti-PMS2	
<b>Technique corollaire (IHC)</b>		
<b>Modalités de prélèvement</b>	<b>Type de prélèvement</b> : exérèse chirurgicale de préférence. Possible sur biopsie <b>Type de tumeur</b> : Tumeur primitive endométriale de préférence ou métastase. <b>Quantité de matériel</b> : choisir un bloc riche en cellules tumorales. Pas de nécessité de bloc de tissu normal sauf si demande expresse de l'avis oncogénétique spécialisé ou du laboratoire de biologie moléculaire.	
<b>Modalités de fixation :</b> <b>-instabilité micro satellitaire</b>  <b>- immunohistochimie</b>	<b>Tumeur congelée ou fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)  <b>Tumeur fixée et incluse en paraffine uniquement</b> (non réalisable sur tissu congelé): fixateur gold standard = formol, interprétation parfois difficile pour les autres fixateurs (AFA, Bouin, substitut du formol)	
<b>Laboratoire</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU, Purpan (responsables : Dr J Selves, D Grand) dans le cadre de la plate-forme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Midi-Pyrénées, labellisée et soutenue par l'INCA.	
<b>Délai de réponse</b>	2 à 3 semaines	



## 5 SÉNOLOGIE

### 5.1 Arbre décisionnel Statut *HER2*





## 5.2 Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient

<b>Technique</b>	FISH / CISH HER2 / SISH	
<b>But</b>	Evaluer le niveau d'amplification du gène <i>HER2</i> au niveau des cellules carcinomateuses infiltrantes, sur coupe histologique	
<b>Indication</b> ✱	Indispensable (indications restreintes)	Thérapeutique : <b>thérapies ciblées anti-HER2</b> (trastuzumab/Herceptin®, lapatinib/Tykerb®) Pronostique : surexpression de <i>HER2</i> corrélée à un mauvais pronostic
	Indications en recours à l'immunohistochimie (IHC) de première intention (cf arbre décisionnel) : <ul style="list-style-type: none"><li>❑ Systématique pour les cas IHC score 2+</li><li>❑ En cas d'IHC ininterprétable ou litigieuse</li><li>❑ En cas de marquage 3+ hétérogène</li><li>❑ Réalisable sur cytologie si seul matériel accessible (pas d'IHC <i>HER2</i> possible sur cytologie)</li><li>❑ Dans le cadre de test Assurance Qualité (calibration technique IHC)</li></ul> <i>Réalisation dans un laboratoire expérimenté pour la FISH HER2 avec démarche assurance qualité obligatoire.</i>	
<b>Modalités de prélèvement</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>❑ Tout tissu fixé et inclus en paraffine à l'exclusion du tissu osseux (décalcification)</li><li>❑ Possible sur tissu congelé</li><li>❑ Réalisable sur prélèvement cytologique</li></ul>	
<b>Modalités de fixation</b> ✱	<ul style="list-style-type: none"><li>❑ Fixateur optimal : Formol tamponné</li><li>❑ Technique possible sur les autres fixateurs à l'<u>exclusion</u> des fixateurs avec acide picrique de type Bouin aqueux et Duboscq.</li><li>❑ Délai de fixation rapide (à moins d'1h de la dévascularisation)</li><li>❑ Fixation minimale de 24h pour les pièces, 6h pour les biopsies (jamais plus de 48h, surfixation) (jamais moins de 6h, sous fixation)</li><li>❑ Ouvrir les pièces (éviter sous-fixation)</li></ul>	

La technique est disponible en Midi Pyrénées dans les centres spécialisés (ICR, CHU Toulouse) ainsi que dans certains laboratoires et cabinets de pathologies privés.



## \* 705'Examens de biologie moléculaire utiles à la prise en charge du patient

Ces techniques sont actuellement disponibles sur la plate forme de l'Institut Claudius Regaud.

- Contact : [Dr Magali Lacroix-Triki](#)  
Département de Biologie et de Pathologie  
Institut Claudius Regaud  
20-24 rue du pont Saint Pierre  
31052 Toulouse cedex, France  
Tél : +33 5 61 42 42 33  
Fax : +33 5 61 42 46 02

<b>Technique</b>	FISH split apart ETV6
<b>But</b>	Recherche de réarrangement d'ETV6 au niveau du sous-type de carcinome du sein de type sécrétoire, sur coupe histologique.
<b>Indication</b>	Utile diagnostique
<b>Modalités de fixation</b>	<input type="checkbox"/> Fixateur optimal : Formol tamponné <input type="checkbox"/> Technique possible sur les autres fixateurs <u>à l'exclusion</u> des fixateurs avec acide picrique de type Bouin aqueux et Duboscq.

<b>Technique</b>	FISH FGFR2 / CISH FGFR1
<b>But</b>	Recherche par amplification de FGFR1 et FGFR2
<b>Indication</b>	Utile au traitement (essais cliniques avec inhibiteurs de FGFR)
<b>Modalités de fixation</b>	<input type="checkbox"/> Fixateur optimal : Formol tamponné <input type="checkbox"/> Technique possible sur les autres fixateurs <u>à l'exclusion</u> des fixateurs avec acide picrique de type Bouin aqueux et Duboscq.



## 6 SARCOMES

### 6.1 Examen de biologie moléculaire indispensable à la prise en charge du patient

La caractérisation moléculaire d'un sarcome est une **RECOMMANDATION FORTE**. En effet :

- dans l'expérience du Groupe Sarcome Français (GSF), malgré une relecture centralisée, la pratique systématique de ces examens permet de redresser le diagnostic du type de sarcome dans près de 10 % des cas ;
- certains types de sarcome sont susceptibles de bénéficier d'une thérapeutique ciblée ;
- cette caractérisation moléculaire est nécessaire pour les cas inclus dans un protocole.

Pour de plus amples informations, d'autres renseignements sont à disposition sur le site du [GSF-GETO](http://GSF-GETO) .

### 6.2 Examens moléculaires réalisés à l'Institut Bergonié.

#### Institut Bergonié

Département de Pathologie  
229, cours de l'Argonne  
33076 BORDEAUX

Contact :  
[COINDRE Jean-Michel](mailto:COINDRE Jean-Michel)

Tel : 05 56 33 33 29  
Secrétariat : 05 56 33 04 36  
Fax : 05 56 33 04 38

Type de tumeur	Anomalie moléculaire	Type d'analyse	Matériel utilisable	Délai moyen de réponse
Synovialosarcome	Transcrits de fusion SYT-SSX1/SSX2	RT-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine
	Réarrangement de SYT	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
Ewing	Transcrits de fusion EWS-FLI1/ERG	RT-PCR sur Taqman	- Congélation	Une semaine
	Réarrangement de EWS	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
Rhabdomyosarcome alvéolaire	Transcrits de fusion FKHR-PAX3/PAX7	RT-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine
	Réarrangement de FKHR	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
Sarcome à cellules claires	Transcrits de fusion EWS-ATF1	RT-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine
	Réarrangement de EWS	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
Fibrosarcome infantile - Carcinome sécrétoire	Transcrits de fusion ETV6-NTRK3	RT-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine



juvénile mammaire - Néphrome mésoblastique	Réarrangement de ETV6	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
Tumeur desmoplastique à cellules rondes	Transcrits de fusion WT1-EWS	RT-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine
	Réarrangement de EWS	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	Transcrits de fusion TEC- EWS/TAF2N	RT-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine
	Réarrangement de EWS	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
Liposarcome myxoïde et à cellules rondes	Réarrangement de CHOP	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
	Transcrits de fusion TLS- CHOP	RT-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine
	Réarrangement de EWS, TLS	FISH	- Paraffine formol - Empreinte	15 jours
Sarcome fibromyxoïde de bas grade	Réarrangement de TLS	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
	Fusion de TLS/CREB3L2	FISH	- Empreintes - Congélation - Paraffine formol	1 à 2 semaines
	Fusion de TLS/CREB3L2	FISH RT-PCR	- Paraffine formol - Congélation	2 semaines
Liposarcome différencié/dédifférencié	Amplification de MDM2/CDK4	Q-PCR sur Taqman	- Congélation - Paraffine	Une semaine
	Amplification de MDM2/CDK4	FISH	- Paraffine formol - Empreintes	15 jours
GIST	Mutations des exons 9, 11, 13 et 17 de KIT et des exons 12, 14 et 18 de PDGFRA	Criblage par DHPLC et séquençage bidirectionnel de l'exon variant	- Congélation - Paraffine formol	Un mois
Histiocytofibrome angiomatoïde	Réarrangement de EWS et TLS	FISH	- Empreintes - Paraffine formol	15 jours
Dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand	Réarrangement de PDGFB	FISH	- Empreintes - Paraffine formol	15 jours
	Fusion COL1A1-PDGFB	FISH	- Empreintes - Paraffine formol	15 jours
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	Réarrangement de ALK	FISH	- Empreintes - Paraffine formol	15 jours
Fibromatose et tumeur desmoïde extra- abdominale	Mutation de $\beta$ -caténine	Séquençage direct	- Congélation - Paraffine formol	1 semaine



### 6.3 Examens moléculaires réalisés à l'Institut Claudius Regaud

<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Amplification du gène MDM2</b>
<b>BUT</b>	Diagnostic des <b>liposarcomes différenciés et indifférenciés</b>
<b>Indication</b>	Tumeur adipeuse de diagnostic difficile et sarcome indifférencié de localisation compatible avec un liposarcome
<b>Technique</b>	FISH
<b>Modalités de fixation</b>	Tissus fixés et inclus en paraffine. Tous les fixateurs sans acide picrique peuvent être utilisés mais le plus adapté est le formol. Merci de préciser le fixateur que vous utilisez
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Dr Philippe Rochaix, ICR, Toulouse
<b>Délai de réponse</b>	3 semaines



<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Translocation t(17;22)(q22;q13)</b>
<b>BUT</b>	Diagnostic de <b>dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand</b>
<b>Indication</b>	Tumeur fusocellulaire dermique et fibrosarcome possiblement développé sur un dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand pré-existant
<b>Technique</b>	FISH (split et fusion)
<b>Modalités de fixation</b>	Tissus fixés et inclus en paraffine. Tous les fixateurs sans acide picrique peuvent être utilisés mais le plus adapté est le formol. Merci de préciser le fixateur que vous utilisez
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Dr Philippe Rochaix, ICR, Toulouse
<b>Délai de réponse</b>	3 semaines



<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Réarrangement de SYT</b>
<b>BUT</b>	Diagnostic des <b>synoviosarcomes</b>
<b>Indication</b>	Sarcomes à cellules fusiformes d'aspect ou de clinique compatible
<b>Technique</b>	FISH (split)
<b>Modalités de fixation</b>	Tissus fixés et inclus en paraffine. Tous les fixateurs sans acide picrique peuvent être utilisés mais le plus adapté est le formol. Merci de préciser le fixateur que vous utilisez
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Dr Philippe Rochaix, ICR, Toulouse
<b>Délai de réponse</b>	3 semaines

#### ✘ 6.4 Examens moléculaires réalisés au CHU Toulouse

Texte long : cf [chapitre 7-2 \(GIST\)](#)

<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Mutation KIT et PDGFR alpha</b>	
<b>BUT</b>	Identifier les mutations KIT et PDGFR alpha des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)	
<b>Indication</b>	Indispensable	<b>Marqueur diagnostique</b> : des GIST KIT-négatives en immunohistochimie (toute tumeur conjonctive susceptibles d'être une GIST mais n'exprimant pas KIT ni DOG1)
	Utile et recommandée	<b>Marqueur thérapeutique</b> : toutes les GIST localement avancée (traitement néo-adjuvant) ou métastatique pour adapter le traitement par imatinib. Traitement adjuvant : toute GIST avec un risque significatif de rechute selon la classification de Miettinen (AFIP)
<b>Technique</b>	1 / extraction ADN de la tumeur après contrôle morphologique 2/ Criblage par HRM des exons 8, 9, 11,13, 17 de KIT et des exons 12,14 et 18 de PDGFR-A puis séquençage de l'exon variant pour identification de la mutation.	
<b>Modalités de prélèvement</b>	<b>Type de prélèvement</b> : exérèse chirurgicale ou biopsie (matériel suffisant et de qualité adéquate pour biologie moléculaire). <b>Type de tumeur</b> : Tumeur primitive ou métastase. <b>Quantité de matériel</b> : quantité ADN suffisant pour analyse de tous les exons.	
<b>Modalités de conservation tissulaire</b>	<b>Tumeur congelée de préférence ou fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)	
<b>Laboratoire</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU, Purpan (Responsables : Dr J Selves, D Grand) et laboratoire d'Hématologie (Pr E Delabesse) dans le cadre de la plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Midi-Pyrénées, labellisée et soutenue par l'INCa	
<b>Délai de réponse</b>	3 semaines	



## 7 PATHOLOGIE DIGESTIVE

---

### 7.1 Cancer colo-rectal

✘ • **A visée diagnostique (domaine de l'oncogénétique)**

Il existe une indication d'examen de biologie moléculaire sur tumeur indispensable au diagnostic de syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) ou syndrome de Lynch : l'instabilité microsatellitaire (MSI). Seules les tumeurs MSI+ peuvent s'intégrer dans le cadre d'un syndrome de Lynch. L'étude somatique (de la tumeur) est alors complétée par une analyse immunohistochimique des protéines MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2). L'extinction de MSH2 et/ou MSH6 est spécifique du syndrome de Lynch contrairement à l'extinction de MLH1 qui s'observe aussi dans les tumeurs MSI+ sporadiques. Parmi les tumeurs MSI+ avec perte d'expression de MLH1 en immunohistochimie, deux analyses supplémentaires sont utiles pour distinguer les formes sporadiques des syndromes de Lynch : la mutation BRAF V600E et la méthylation du promoteur de MLH1 qui ne sont observées que dans les cancers sporadiques et pas dans les syndromes de Lynch.

Dans le sang, la recherche de mutation constitutionnelle des gènes MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 est ensuite indispensable au diagnostic de syndrome de Lynch.

*En pratique, sur la plateforme de Midi-Pyrénées :*

La recherche d'instabilité microstallitaire est réalisée selon la stratégie proposée dans l'arbre décisionnel ci-dessous (chez des patients sélectionnés sur l'âge ou les antécédents personnels ou familiaux)

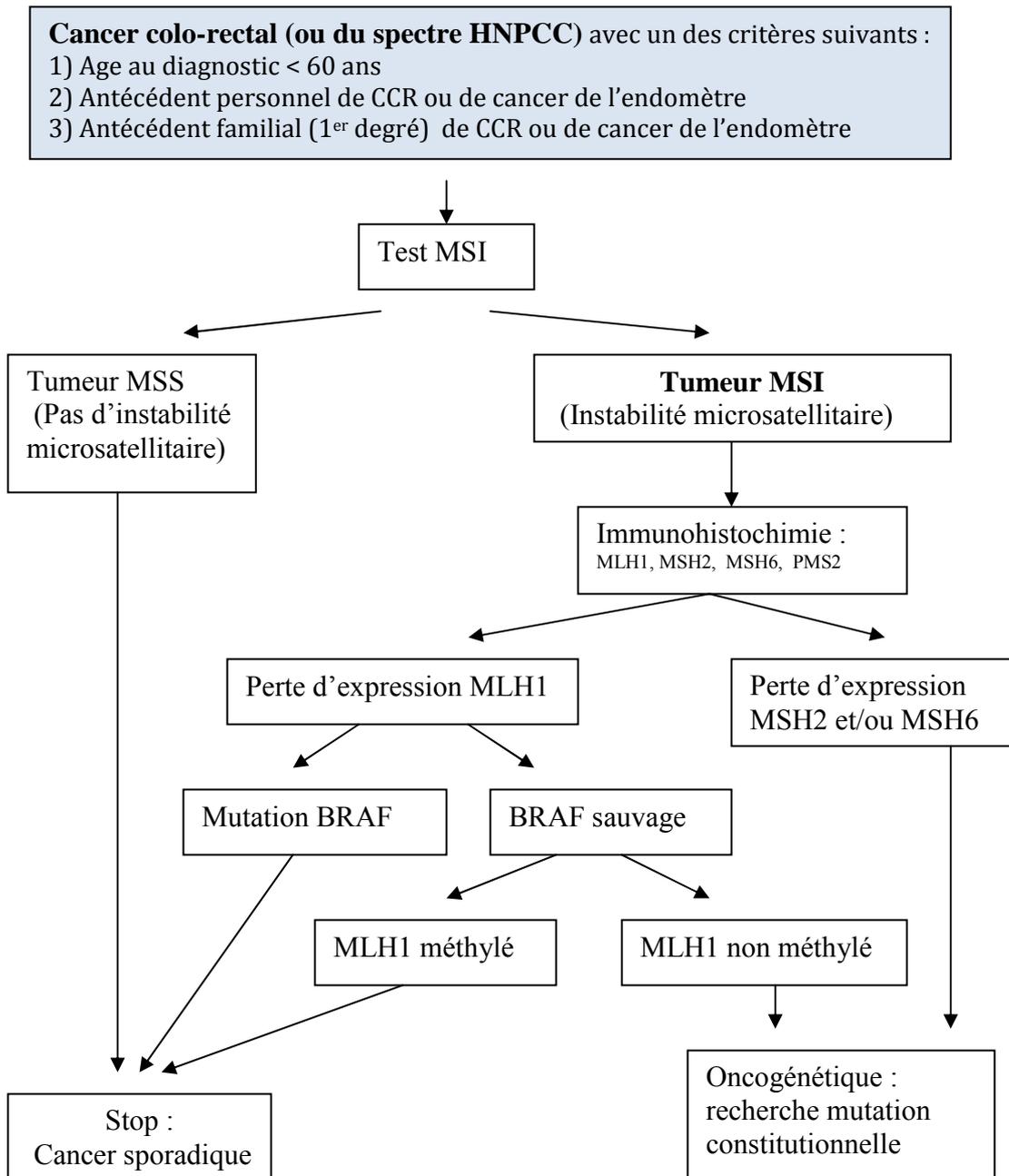
La mutation de BRAF et la recherche d'une méthylation du promoteur de MLH1 sont réalisées pour les tumeurs MSI + avec perte d'expression de MLH1 en immunohistochimie.

Pour les polyposes, il n'existe aucun examen de biologie moléculaire sur tumeur indispensable ou utile au diagnostic. Dans le sang, la recherche de différentes mutations sont indispensables au diagnostic en fonction du phénotype clinique, du mode de transmission et du type histologique des polypes : gène APC et gène MYH pour les polyposes adénomateuses, autres gènes pour les polyposes non adénomateuses (SMAD4, BMPR1A, PTEN, STK11, etc.)

Les recherches de mutation constitutionnelles (germinales) sont effectuées sur les leucocytes sanguins et sont toujours réalisées dans le cadre d'une consultation d'oncogénétique par un laboratoire agréé pour l'oncogénétique (laboratoire d'oncogénétique, G Favre / C. Toulas, Institut Claudius Regaud).



## ✱ Arbre diagnostique des cancers colorectaux liés au syndrome de Lynch :



- **A visée thérapeutique :**

### Prescription d'anti-EGFR :

Seule la recherche de mutation de KRAS (codon 12 et 13) est indispensable à la prescription des anti-EGFR (cetuximab / Erbitux® et panitumumab / Vectibix®) : prescription conditionnée par l'absence de mutation du gène K-RAS dans la tumeur).

La mutation BRAF (touchant 5% à 10% des CCR parmi les tumeurs KRAS non mutées) est un facteur pronostique péjoratif. Son rôle prédictif de non réponse aux anti-EGFR n'est en revanche pas encore clairement établi ; sa recherche n'est donc pas à ce jour indispensable à leur prescription. A ce titre, l'INCa a lancé un programme de détection prospective de cette mutation pour l'année 2011.



De nombreux autres marqueurs prédictifs à la réponse aux anti-EGFR pour les patients « KRAS sauvage » sont encore en cours d'évaluation (niveau d'amplification EGFR, expression de l'amphiréguline et de l'épiréguline, expression PTEN, mutation NRAS, autres mutation KRAS), mais le niveau de preuve n'est pas à ce jour suffisant. Leur recherche n'est donc pas recommandée actuellement.

En pratique, sur la plateforme de Midi-Pyrénées, en indication de traitement par anti-EGFR, une recherche conjointe des mutations KRAS et BRAF sera réalisée à partir de Février 2011.

✘ Traitement adjuvant des CCR stade II avec instabilité microsatellitaire (MSI+):

Bien que non recommandée pour l'ensemble des CCR de stade II, la chimiothérapie adjuvante est préconisée dans certains cas reconnus à plus haut risque (T4, occlusion, perforation...). Le schéma proposé peut alors se limiter à du 5FU seul, sauf pour les tumeurs présentant une instabilité microsatellitaire (MSI+) compte-tenu de l'effet délétère démontré du 5FU en adjuvant pour ces tumeurs et, par ailleurs, de leur meilleur pronostic.

La recherche d'instabilité microsatellitaire chez les patients de stade II, chez qui un traitement adjuvant est envisagé, est utile à la décision thérapeutique.

- **A visée pronostique :**

Aucun examen n'est indispensable à visée pronostique. La mutation de BRAF et l'instabilité microsatellitaire sont des facteurs pronostiques prometteurs mais leur utilisation systématique en pratique de routine n'est pas validée car sans impact thérapeutique actuellement.

Modalités :

<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Mutation KRAS dans les cancers colorectaux au stade METASTATIQUE</b>	
<b>BUT</b>	Identifier une mutation des codons 12 ou 13 du gène KRAS dans la tumeur	
<b>Indication</b>	Indispensable	Marqueur thérapeutique : Facteur de prédiction à la réponse aux anti-EGFR. La prescription d'anti-EGFR est conditionnée à l'absence de mutation KRAS (KRAS sauvage). quelque soit la thérapie ciblée (cetuximab /Erbix® ou panitumumab /Vectibix®).
<b>Technique</b>	1 / extraction ADN de la tumeur (avec macrodissection de la zone la plus riche en cellules tumorales) 2/ amplification ADN par PCR 3/ génotypage (à Toulouse : criblage par HRM + hybridation spécifique d'allèle par Taqman pour les profils mutés)	
<b>Modalités de prélèvement</b>	<b>Type de prélèvement :</b> Biopsie ou Exérèse chirurgicale. <b>Type de tumeur :</b> Tumeur primitive colo-rectale ou métastase. <b>Quantité de matériel :</b> choisir le bloc le plus riche en cellules tumorales (> 50% de cellules tumorales si possible).	
<b>Modalités de fixation</b>	Tumeur congelée ou <b>fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)	
<b>Laboratoire</b>	<b>Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU Purpan</b> (responsables : Dr J Selves, D Grand) dans le cadre de la plate-forme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Midi-Pyrénées, labellisée et soutenue par l'INCA.	
<b>Délai de réponse</b>	7 à 8 jours ✘	



<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Mutation BRAF dans les cancers colorectaux</b>	
<b>BUT</b>	Identifier la mutation V600E du gène BRAF dans la tumeur	
<b>Indication</b>	Utile (à faire en même temps que la recherche de mutation KRAS)	Marqueur thérapeutique (cancer colo-rectal au stade métastatique) : Facteur de non réponse à la réponse aux anti-EGFR pour les tumeurs KRAS sauvage. Non indispensable à la prescription d'anti-EGFR (cetuximab /Erbix® ou panitumumab /Vectibix®)
	Utile	Marqueur pronostique (cancer colo-rectal métastatique)
	Utile et recommandée	Marqueur diagnostique (cancer colo-rectal avec instabilité microsatellitaire et perte d'expression de MLH1 en immunohistochimie) : marqueur des cancers sporadiques (élimine un syndrome de Lynch)
<b>Technique</b>	1 / extraction ADN de la tumeur (avec macrodissection de la zone la plus riche en cellules tumorales) 2/ amplification ADN par PCR 3/ génotypage (à Toulouse : hybridation spécifique d'allèle par Taqman)	
<b>Modalités de prélèvement</b>	<b>Type de prélèvement</b> : Biopsie ou Exérèse chirurgicale. <b>Type de tumeur</b> : Tumeur primitive colo-rectale ou métastase. <b>Quantité de matériel</b> : choisir le bloc le plus riche en cellules tumorales (> 50% de cellules tumorales si possible).	
<b>Modalités de fixation</b>	Tumeur congelée ou <b>fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)	
<b>Laboratoire</b>	<b>Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU Purpan</b> (responsables : Dr J Selves, D Grand) dans le cadre de la plate-forme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Midi-Pyrénées, labellisée et soutenue par l'INCA.	
<b>Délai de réponse</b>	7 à 8 jours	



<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Instabilité micro satellitaire dans les cancers colo-rectaux (ou autres cancers du spectre HNPCC)</b>	
<b>BUT</b>	Sélection de patients susceptibles d'être porteur d'un syndrome HNPCC	
<b>Indication</b>	Utile et recommandée	<b>Marqueur diagnostique</b> : identifier les patients porteurs d'un syndrome HNPCC par une stratégie en deux étapes : 1/ Test RER (instabilité micro satellitaire +/- immunohistochimie) pour tous les patients avec un cancer colo-rectal : <ul style="list-style-type: none"><li>- Agés de moins de 60 ans</li><li>- ou avec un antécédent personnel ou familial au premier degré de cancer colorectal ou de cancer de l'endomètre ou de cancer de l'intestin grêle ou de cancer urothélial (vessie exclue).</li></ul> 2/ Avis oncogénétique spécialisé pour tous les patients avec test RER positif.
	Utile	<b>Marqueur thérapeutique</b> : pour les cancers colorectaux de stade II, utile à la décision thérapeutique (pas d'indication de traitement adjuvant par 5-FU si tumeur avec instabilité micro satellitaire)
<b>Technique (MSI)</b>	1 / extraction ADN de la tumeur (avec macrodissection de la zone la plus riche en cellules tumorales) 2/ amplification de 5 séquences microsattelitaires par PCR pentaplex 3/ génotypage de ces séquences microsattelites (instabilité microsattelitaire ou MSI si au moins 2 microsattelites instables sur cinq)	
<b>Technique corollaire (IHC)</b>	En complément de la recherche d'instabilité microsattelitaire ou pour les cas avec très peu de cellules tumorales ou fixateur ne permettant pas d'étude en biologie moléculaire avec les 4 anticorps : anti-MLH1, anti-MSH2, anti-MSH6 et anti-PMS2.	
<b>Modalités de prélèvement</b>	<b>Type de prélèvement</b> : exérèse chirurgicale de préférence. Possible sur biopsie <b>Type de tumeur</b> : Tumeur primitive colo-rectale de préférence ou métastase. Pas d'indication pour les adénomes (sauf demande expresse de l'avis oncogénétique spécialisé, car possibilité de faux-négatifs) <b>Quantité de matériel</b> : choisir un bloc riche en cellules tumorales (> 20% de cellules tumorales). Pas de nécessité de bloc de tissu normal sauf si demande expresse de l'avis oncogénétique spécialisé ou du laboratoire de biologie moléculaire.	
<b>Modalités de fixation :</b> <b>- instabilité microsattelitaire</b>  <b>- immunohistochimie</b>	<b>Tumeur congelée ou fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA).  <b>Tumeur fixée et incluse en paraffine uniquement</b> (non réalisable sur tissu congelé): fixateur gold standard = formol, interprétation parfois difficile pour les autres fixateurs (AFA, Bouin, substitut du formol).	
<b>Laboratoire</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU, Purpan (responsables : Dr J Selves, Dr D Grand) dans le cadre de la plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Midi-Pyrénées, labellisée et soutenue par l'INCa	
<b>Délai de réponse</b>	2 à 3 semaines ✖	



## 7.2 GIST

Pour affirmer formellement un diagnostic de GIST négatif pour l'expression de CD117, il est recommandé de rechercher une mutation des gènes *KIT* et *PDGFRA* (accord d'experts). En dehors des GIST *KIT* négatives, la recherche de mutations des gènes *KIT* et *PDGFRA* par une technique de biologie moléculaire doit progressivement s'intégrer dans la pratique. Le génotypage des GIST est désormais recommandé par les experts européens et américains, en particulier pour les patients devant bénéficier d'un traitement par imatinib. Le type de mutation (en particulier mutation exon 9 de *KIT*) a une influence sur l'efficacité du traitement, et il s'agira de plus en plus d'une aide au choix du traitement et/ou de sa posologie.

On peut cependant résumer les indications de recherche de mutations de *KIT* ou *PDGFRA* ainsi :

- **indispensable au diagnostic des tumeurs *KIT* négatives en immunohistochimie**
- **recommandée** pour tous les patients devant ou pouvant bénéficier d'un traitement par [imatinib](#) (situation métastatique, localement avancée)
- **recommandée** pour le traitement en situation adjuvante (GIST à risque important de rechute)

Test réalisé sur la plateforme de Midi-Pyrénées depuis 2010 (laboratoire d'Anatomie Pathologique et d'Hématologie, CHU Purpan) de façon systématique pour toutes les GIST au diagnostic (sauf micro-GIST).



<b>Anomalie moléculaire</b>	<b>Mutation <i>KIT</i> et <i>PDGFR</i> alpha</b>	
<b>BUT</b>	Identifier les mutations <i>KIT</i> et <i>PDGFR</i> alpha des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)	
<b>Indication</b>	Indispensable	<b>Marqueur diagnostique</b> : des GIST <i>KIT</i> -négatives en immunohistochimie (toute tumeur conjonctive susceptibles d'être une GIST mais n'exprimant pas <i>KIT</i> ni <i>DOG1</i> )
	Utile et recommandée	<b>Marqueur thérapeutique</b> : toute GIST localement avancée (traitement néo-adjuvant) ou métastatique pour adapter le traitement par imatinib. Traitement adjuvant : toute GIST avec un risque significatif de rechute selon la classification de Miettinen (AFIP)
<b>Technique</b>	1 / extraction ADN de la tumeur après contrôle morphologique 2/ Criblage par HRM des exons 8, 9, 11,13, 17 de <i>KIT</i> et des exons 12,14 et 18 de <i>PDGFR</i> -A puis séquençage de l'exon variant pour identification de la mutation.	
<b>Modalités de prélèvement</b>	<b>Type de prélèvement</b> : exérèse chirurgicale ou biopsie (matériel suffisant et de qualité adéquate pour biologie moléculaire). <b>Type de tumeur</b> : Tumeur primitive ou métastase. <b>Quantité de matériel</b> : quantité ADN suffisant pour analyse de tous les exons.	
<b>Modalités de conservation tissulaire</b>	<b>Tumeur congelée de préférence ou fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)	
<b>Laboratoire</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU, Purpan (Responsables : Dr J Selves, D Grand) et laboratoire d'Hématologie (Pr E Delabesse) dans le cadre de la plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Midi-Pyrénées, labellisée et soutenue par l'INCa	
<b>Délai de réponse</b>	3 semaines	



### \* 7.3 Cancers gastriques

#### Pas d'indication à visée diagnostique ni pronostique.

- **A visée thérapeutique**, il est indispensable d'évaluer le niveau d'amplification du gène HER2 pour prescrire une thérapie ciblée anti-HER2 (trastuzumab Herceptine®) dans le traitement des cancers gastriques métastatiques (2010).

Indication : cancers gastriques ou du bas œsophage métastatiques en adjonction avec une chimiothérapie de première ligne.

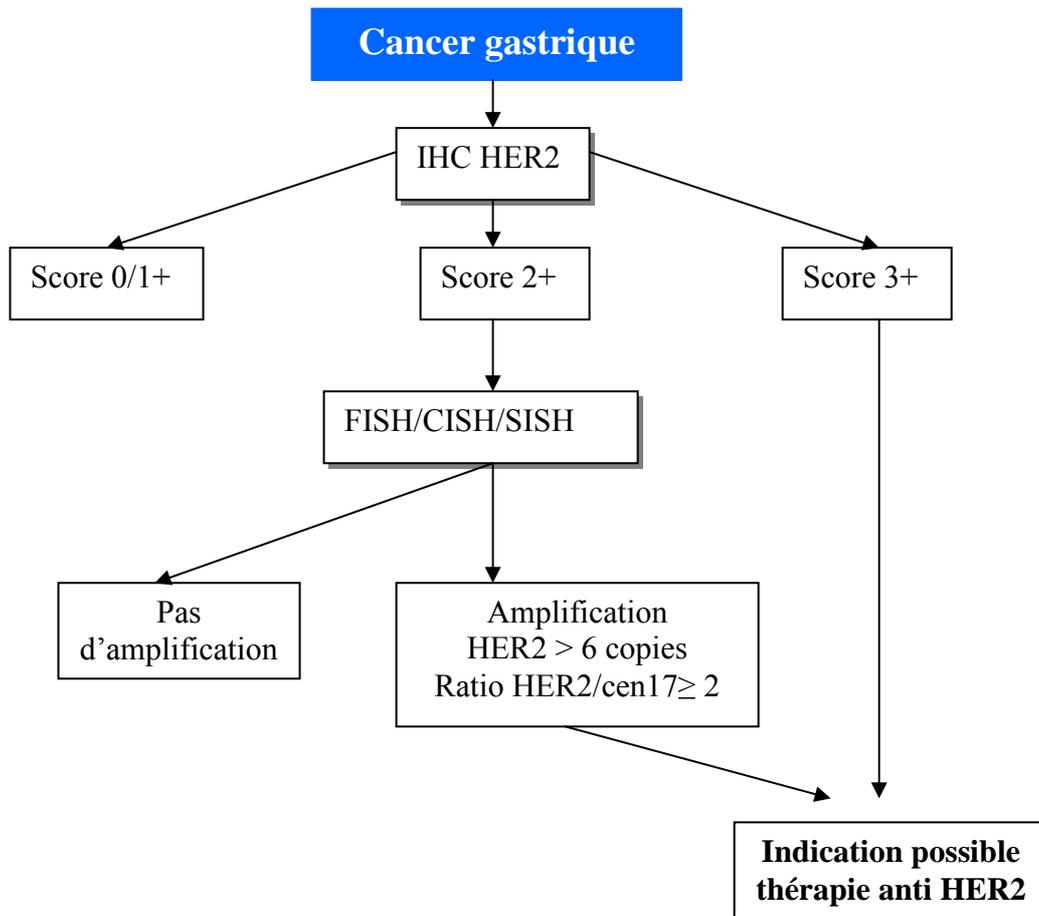
La procédure d'évaluation de l'amplification de HER2 est inspirée de celle pratiquée pour le cancer du sein avec *des modifications concernant l'évaluation immuno-histochimique* (Hofmann M. Histopathology 2008). Ces modifications sont de 2 ordres : 1/ un marquage baso-latéral membranaire (en U) est considéré équivalent à un marquage membranaire complet (même score) et 2/ le seuil de positivité est différent sur matériel chirurgical (positif si  $\geq 10\%$  de cellules marquées) ou biopsique (score positif quelque soit le nombre de cellules positives) compte –tenu de l'importante hétérogénéité des tumeurs gastriques. Des recommandations pour l'évaluation du score immuno-histochimique HER2 dans les cancers gastriques a été publié récemment, recommandé et validé par l'AFAQAP (Rüschoff J, Virchows Archiv 2010 : 457 :299-307)

#### \* **Recommandations pour l'évaluation du score IHC de HER2 pour les cancers gastriques** (Rüschoff J, Virchows Archiv 2010).

Immuno-marquage échantillon chirurgical	Immuno-marquage biopsie	Score
Pas de marquage ou marquage membranaire < 10 % de cellules	Pas de marquage ou marquage membranaire < 5 cellules tumorales	<b>0</b>
Marquage membranaire faible/imperceptible $\geq 10$ % des cellules ; marquage limité à une petite partie de la membrane, seulement visible à fort grossissement (X40).	Marquage membranaire faible/imperceptible $\geq 5$ cellules tumorales cohésives ; marquage limité à une petite partie de la membrane, seulement visible à fort grossissement (X40).	<b>1+</b>
Marquage membranaire complet ou baso-latéral (en U) ou latéral faible à modéré $\geq 10$ % de cellules. Marquage clairement visible au grossissement intermédiaire (X10-20)	Marquage membranaire complet ou baso-latéral (en U) ou latéral faible à modéré $\geq 5$ cellules tumorales cohésive. Marquage clairement visible au grossissement intermédiaire (X10-20)	<b>2+</b>
Marquage membranaire complet ou baso-latéral (en U) ou latéral modéré à intense $\geq 10$ % de cellules. Marquage clairement visible à faible grossissement (X2,5-5)	Marquage membranaire complet ou baso-latéral (en U) ou latéral modéré à intense $\geq 5$ cellules tumorales cohésives. Marquage clairement visible à faible grossissement (X2,5-5)	<b>3+</b>



## Arbre décisionnel statut HER2





- **Examen de biologie moléculaire :**

Anomalie moléculaire	Amplification du gène HER2	
<b>BUT</b>	Marqueur thérapeutique : facteur de prédiction à la réponse aux anti-HER2.	
<b>Indication</b>	Indispensable	Traitement par anti-HER2 des cancers gastriques ou du bas œsophage métastatiques en adjonction avec une chimiothérapie de première ligne. En recours à l'immuno-histochimie de première intention (cf. arbre décisionnel) *Systématique pour les scores 2+ *En cas d'IHC ininterprétable ou litigieuse
<b>Technique</b>	FISH/CISH/SISH	
<b>Modalités de prélèvement</b>	<b>Type de prélèvement :</b> Biopsie ou Exérèse chirurgicale. <b>Type de tumeur :</b> Tumeur primitive. Métastase possible. <b>Quantité de matériel :</b> choisir le bloc avec les zones tumorales les mieux différenciées	
<b>Modalités de fixation</b>	Tissu <b>fixé et inclus en paraffine</b> (à l'exclusion des fixateurs avec acide picrique tels que le Bouin ou le Duboscq aqueux), de préférence fixé en formol, éviter AFA.	
<b>Laboratoire</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU Purpan (Responsables : Dr J Selves, Dr M Danjoux) dans le cadre de la plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Midi-Pyrénées, labellisée et soutenue par l'INCa	
<b>Délai de réponse</b>	7 à 10 jours	

#### 7.4 Cancers œsophage, canal anal

Pas d'examens de biologie moléculaire indispensable ou utile à ce jour.

#### 7.5 Cancer du foie

Pas d'examens de biologie moléculaire indispensable ou utile à ce jour.

#### 7.6 Tumeur bénigne du foie

- Utile au diagnostic et à la classification des adénomes hépatocellulaires mais uniquement réalisée dans le cadre d'un projet de recherche (J.Zuckman-Rossi, Paris / Bordeaux).
- Recherche mutation Bêta-caténine plateforme Midi Pyrénées prévue courant 2011 (Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU Purpan , Dr J Selves, D Grand)

#### 7.7 Cancer du pancréas

Pas d'examens de biologie moléculaire indispensable ou utile à ce jour.

#### 7.8 Tumeurs endocrines

Pas d'examens de biologie moléculaire indispensable ou utile à ce jour.

#### 7.9 Lymphomes digestifs :

Lymphome de MALT : [cf : lymphome](#)

#### 7.10 Sarcomes (autres que GIST) :

[cf : Sarcome.](#)



## 8 ORL

---

Aucun examen de biologie moléculaire n'est actuellement utile à la prise en charge du patient.

<b>Anomalie moléculaire</b>	Sans objet
<b>BUT</b>	
<b>Indication</b>	Aucune
<b>Technique</b>	Sans objet
<b>Modalités de prélèvement</b>	Sans objet
<b>Modalités de fixation</b>	Sans objet
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Sans objet
<b>Délai de réponse</b>	Sans objet



## ✱ 9 MELANOME

La classification anatomique des mélanomes distingue les formes cutanées (les plus fréquentes), muqueuses, oculaires et leptoméningées.

Les mélanomes cutanés se déclinent en mélanomes superficiels extensifs, naevocytoides, acrolentigineux, de Dubreuilh et nodulaires. Cependant, bien que ces mélanomes soient différents en termes de présentation clinique et histopathologique, cette classification n'a aucun intérêt pronostique : à épaisseur de Breslow égale, le pronostic est similaire quelle que soit la forme histologique. Les facteurs pronostiques qui restent déterminants sont l'épaisseur selon l'indice de Breslow, la présence/absence d'une ulcération. La classification AJCC révisée en 2009 tient également compte de l'index mitotique.

Probablement du fait de l'hétérogénéité moléculaire des mélanomes, on ne disposait pas jusqu'à aujourd'hui de traitement ciblé efficace dans le mélanome métastatique. Le développement récent de plusieurs molécules, actuellement en phases avancées d'essais cliniques, laisse présager que certaines d'entre elles bénéficieront prochainement d'une autorisation de mise sur le marché. Ces molécules ciblent des anomalies moléculaires des gènes BRAF, c-kit, NRAS, connues dans d'autres types de cancers et les voies de signalisation intra cellulaires en aval. Il existe donc aujourd'hui des indications d'examen de biologie moléculaire indispensables à la prise en charge thérapeutique puisque ces anomalies moléculaires deviennent des « biomarqueurs émergents » dans le **mélanome métastatique** et leur screening est un pré-requis à l'éligibilité du patient pour les thérapeutiques émergentes : inhibiteurs de BRAF V600E, inhibiteurs de c-KIT, inhibiteurs de MEK 1,2 (cf. tableau ci-dessous).

MÉLANOME				
Biomarqueur	Fonction du biomarqueur	Molécule	Activité de la molécule	Essais cliniques en cours
Mutation de BRAF : V600E	Cible moléculaire	PLX4032/ RO5185426	Inhibiteur de BRAF	Phase II : NCT00949702 Phase III : NCT01006980
		GSK2118436	Inhibiteur de BRAF	Phase I : NCT00880321
	Prédicatif de la réponse	AZD6244/ ARRY-142886	Inhibiteur de MEK	Phase II : NCT00936221
		GSK1120212	Inhibiteur de MEK	Phase II : NCT01037127
Mutations de c-KIT	Cible moléculaire	Imatinib Mesylate	Inhibiteur de c-kit	Phase II : NCT00470470
		Nilotinib	Inhibiteur de c-kit	Phase III : NCT01028222 Phase II : NCT01099514
		Sunitinib	Inhibiteur de c-kit	Phase II : NCT00631618
Mutation L576P de c-KIT	Cible moléculaire + [résistance à l'imatinib, au nilotinib et au sunitinib]	Dasatinib	Inhibiteur de c-kit	Phase II : NCT00700882

Le document de référence de l'INCa est téléchargeable sur le site : [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)



Afin d'anticiper l'arrivée de ces nouvelles molécules et de les rendre disponibles le plus rapidement possible, l'INCa a mis en place un programme de détection prospective de ces biomarqueurs émergents par les plateformes de biologie moléculaire labellisées.

Dans le contexte du mélanome métastatique, les mutations d'intérêt sont principalement dominées par les mutations de **BRAF** (V600E, qui concerne 50 à 60 % des cas de mélanome, formes nodulaires et SSM principalement) de **C-KIT** (qui concerne 5 à 15% des cas, formes acro-lentigineuses, muqueuses et mélanome de Dubreuilh essentiellement) et de **N-RAS** (qui concerne 10 à 20% des cas).

La recherche de la mutation V600E de l'exon 15 du gène BRAF (la plus fréquemment retrouvée), des mutations des exons 8, 9, 11, 13 et 17 du gène c-kit et des mutations du gène NRAS (codons 12, 13, 18, 61 et 62) peut être réalisée sur le mélanome au diagnostic ou sur les métastases. Elle peut être faite à partir de matériel congelé ou fixé. Il existe cependant des impératifs de qualité de l'ADN extraits des blocs fixés et inclus en paraffine, qui doit permettre d'amplifier des fragments de taille suffisante. Certains fixateurs à base d'acide picrique comme le liquide de Bouin sont, par exemple, à proscrire.

*Tests réalisés sur la plateforme de Midi-Pyrénées depuis Octobre 2010 (laboratoires d'Anatomie Pathologique et Hématologie, CHU Purpan) pour les mélanomes métastatiques.*

<b>Anomalie moléculaire</b>	Mutation BRAF V600E
<b>BUT</b>	Thérapeutique
<b>Indication</b>	Mélanome métastatique
<b>Technique</b>	Discrimination allélique Taqman
<b>Modalités de prélèvement</b>	Sans objet
<b>Modalités de fixation</b>	<b>Tumeur congelée ou fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU, Purpan Responsable : Pr Lamant
<b>Délai de réponse</b>	4 à 7 jours à partir du moment où le prélèvement est arrivé sur la plate-forme.

<b>Anomalie moléculaire</b>	Mutation c-Kit
<b>BUT</b>	Thérapeutique
<b>Indication</b>	Mélanome métastatique
<b>Technique</b>	Screening de mutations de 5 exons (8, 9, 11, 13,17) par HRM +/- Séquençage.
<b>Modalités de prélèvement</b>	Sans objet
<b>Modalités de fixation</b>	<b>Tumeur congelée ou fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique (Pr Brousset) CHU, Purpan pour la phase préanalytique, Laboratoire d'Hématologie (Pr Delabesse) CHU, Purpan pour la phase analytique Responsable : Pr Lamant
<b>Délai de réponse</b>	10 jours à partir du moment où le prélèvement est arrivé sur la plate-forme.



<b>Anomalie moléculaire</b>	Mutation NRAS
<b>BUT</b>	Thérapeutique
<b>Indication</b>	Mélanome métastatique
<b>Technique</b>	Screening de mutations (codons 12, 13,18, 61 et 62) par HRM +/- Séquençage
<b>Modalités de prélèvement</b>	Sans objet
<b>Modalités de fixation</b>	<b>Tumeur congelée ou fixée et incluse en paraffine</b> (pas d'acide picrique, éviter les autres fixateurs acides tels que l'AFA)
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Brousset, CHU, Purpan Responsable : Pr Lamant
<b>Délai de réponse</b>	10 jours à partir du moment où le prélèvement est arrivé sur la plate-forme.



## 10 THYROÏDE

---

Aucun examen de biologie moléculaire n'est actuellement utile à la prise en charge du patient.

<b>Anomalie moléculaire</b>	Sans objet
<b>BUT</b>	
<b>Indication</b>	Aucune
<b>Technique</b>	Sans objet
<b>Modalités de prélèvement</b>	Sans objet
<b>Modalités de fixation</b>	Sans objet
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Sans objet
<b>Délai de réponse</b>	Sans objet



## 11 UROLOGIE

---

Aucun examen de biologie moléculaire n'est actuellement utile à la prise en charge du patient.

<b>Anomalie moléculaire</b>	Sans objet
<b>BUT</b>	
<b>Indication</b>	Aucune
<b>Technique</b>	Sans objet
<b>Modalités de prélèvement</b>	Sans objet
<b>Modalités de fixation</b>	Sans objet
<b>Personne responsable et lieu de réalisation de l'examen</b>	Sans objet
<b>Délai de réponse</b>	Sans objet



## 12 HEMATOLOGIE

---

*Examens réalisés au laboratoire de Génétique des Hémopathies du CHU de Toulouse-Purpan pour la prise en charge de cancers hématologiques en Midi-Pyrénées.*

### 12.1 Syndromes Myéloprolifératifs

#### 12.1.1 Leucémie myéloïde chronique (LMC)

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est une hémopathie maligne appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs. Elle est caractérisée par la présence d'un marqueur chromosomique au niveau des cellules hématopoïétiques, le chromosome de Philadelphie. Celui-ci est en fait le raccourcissement du bras long du chromosome 22, conséquence de la translocation chromosomique t(9;22)(q34.1;q11.2). Le produit du gène chimérique BCR-ABL, la protéine BCR-ABL, a une forte activité tyrosine kinase et est responsable de la transformation leucémique. Cette protéine est devenue la cible d'un inhibiteur puissant, l'Imatinib, dont l'activité thérapeutique importante a profondément transformé la prise en charge thérapeutique et le pronostic de cette hémopathie.

En France, l'incidence de la LMC est estimée à 1 à 2 nouveaux cas / 100 000 habitants et par an, soit environ 900 nouveaux diagnostics par an en France et environ 40 en Midi-Pyrénées. L'âge moyen du diagnostic est de 54 ans et touche 1,4 homme pour 1 femme. Cinquante pour cent des cas sont des diagnostics fortuits, 97 % en phase chronique, 1,6 % en phase accélérée, 1,4 % en phase blastique d'emblée. La prévalence est susceptible d'augmenter en raison de la diminution nette observée du taux de mortalité au moins au cours des 5 premières années après le diagnostic.

La prise en charge a dramatiquement été modifiée suite à l'arrivée d'inhibiteurs spécifiques de la fonction tyrosine kinase (ITK) de BCR-ABL, d'abord l'imatinib (GLIVEC®) puis le dasatinib (SPRYCEL®) et le nilotinib (TASIGNA®).

Les marqueurs indirects de réponse au traitement sont constitués des réponses cytologique, cytogénétique et moléculaire. Les suivis moléculaires et cytogénétiques permettent d'ajuster le traitement (augmentation de doses ; passage à un autre inhibiteur). Les recommandations du groupe European Leukemia Net ont été publiées dans [Blood, 2006;108:1809](#) et actualisées dans [JCO, 2009 ; 27 : 6041](#) (<http://www.leukemia-net.org>). Les recommandations de ce groupe sont basées sur des critères de pronostic établis et sur un suivi régulier. La réponse au traitement initial (en général imatinib à 400 mg/j) est classée en trois groupes : réponse optimale ; réponse sub-optimale aboutissant éventuellement à une augmentation de dose ou un changement de traitement (ITK de 2<sup>ème</sup> génération); échec conduisant à un changement de traitement.

Pour rappel, la réponse hématologique complète (CHR) est définie quand les plaquettes sont < 450 G/L, les globules blancs < 10 G/L, absence de myélémie, les polynucléaires basophiles < 5% et l'absence de rate. Elle doit être évaluée toutes les 2 semaines jusqu'à son obtention puis tous les 3 mois après obtention. La réponse cytogénétique est évaluée par un caryotype standard analysant plus de 20 métaphases réalisées sur la moelle. Cet examen est coté à la nomenclature des actes de biologie médicale, donc remboursable. Il est réalisé à 3 et 6 mois puis tous les 6 mois jusqu'à obtention de la réponse cytogénétique complète puis tous les 12 mois après obtention de la réponse cytogénétique complète. La réponse cytogénétique complète (CCyR) est caractérisée par l'absence de mitose Ph1+. La réponse cytogénétique partielle (PCyR) est définie par la présence de mitoses Ph1+ de 1 à 35%. Les deux réponses constituent une réponse cytogénétique majeure. L'absence de réponse cytogénétique est définie par un nombre de mitoses Ph1+ supérieur à 95%. La réponse moléculaire est définie par la quantification du transcrite de fusion BCR-ABL1 résultant de la fusion des gènes BCR situé sur le chromosome 22 et ABL1 situé sur le chromosome 9. Dans la leucémie myéloïde chronique, les points de cassure principaux sont situés au niveau des exons historiquement appelés b2 et b3 de BCR (en fait exons 13 et 14 de BCR) et a2 de ABL1 (correspondant réellement au second exon). Il existe des points



de cassure moléculaires plus rares. La protéine de fusion résultant de cette translocation aboutit à une activité tyrosine kinase constitutive cytoplasmique, ayant une fonction transformante. Le suivi moléculaire par PCR quantitative a une sensibilité de l'ordre de 5 logs et représente la seule méthode de suivi après obtention de la réponse cytogénétique complète. Ce suivi est réalisé sur l'ARN, acide nucléique fragile. Il est donc très important de transmettre l'échantillon de sang le plus rapidement au laboratoire en charge de cette analyse avec risque de dégradation de l'échantillon (<24heures). La quantification du transcrite BCR-ABL est gratuite, elle est prise en charge par l'INCA.

En pratique, le transcrite de fusion BCR-ABL1 doit être caractérisé au diagnostic afin d'utiliser une méthode de PCR quantitative spécifique. Cette recherche se fait sur le sang. Les cellules mononucléées sont recueillies après séparation sur FICOLL<sup>®</sup> puis l'ARN est extrait. Un ADN complémentaire est ensuite réalisé. La technique de recherche de tous les transcrits BCR-ABL1 en une PCR a été publiée dans British Journal of Haematology (Typical essential thrombocythaemia does not express bcr-abelson fusion transcript. [Br J Haematol, 2002,116\(4\):812-816.](#)

Le suivi moléculaire du niveau d'expression de BCR-ABL1 par PCR quantitative s'effectue sur le sang tous les 3 mois jusqu'à réponse moléculaire majeure (< 0,1%) puis ensuite au moins tous les 6 mois. La technique de quantification des transcrits BCR-ABL1 a été publiée dans deux articles de Leukemia (Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. [Leukemia. 2003 Dec; 17\(12\): 2474-86](#) ; Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. [Leukemia. 2003 Dec; 17\(12\): 2318-57.](#)

Les résultats de suivi moléculaire sont rendus associés à un graphe de suivi reprenant l'ensemble des points de suivi moléculaire. Le taux de BCR-ABL1 au diagnostic est de l'ordre de 100% (rapport BCR-ABL1/ABL1). Les résultats de suivi sont :

- soit positif avec un rapport exprimé en pourcentage de la quantité de transcrite de fusion BCR-ABL1 sur la quantité de transcrite normal ABL1 (ce dernier transcrite étant utilisé dans ce cas comme indicateur de qualité, ABL1 étant exprimé à un niveau constant dans les cellules hématopoïétiques);
- soit positif non quantifiable quand la précision de la mesure est diminuée (valeur très faible, en-dessous de 0,01%);
- Soit négatif.

La réponse moléculaire majeure (MMR) est définie à un rapport inférieur à 0,1%. L'ensemble des indicateurs de suivi de la leucémie myéloïde chronique permet de classer le patient en 3 groupes :

	Réponse optimale	Réponse sub-optimale	Échec	Alerte
<b>Diagnostic</b>				Haut risque Anomalies CG associées au Ph1
<b>3 mois</b>	CHR Minor CyR (≤65%)	No CyR (>95%)	< CHR	
<b>6 mois</b>	PCyR (≤35%)	< PCyR (>35%)	No CyR (>95%)	
<b>12 mois</b>	CCyR (0)	< CCyR (>1%)	< PCyR (>35%)	<MMR (>0,1%)
<b>18 mois</b>	MMR (≤0,1%)	< MMR (>0,1%)	< CCyR (0)	
<b>A tout moment</b>	MMR stable ou diminuant	Perte MMR (>0,1%) Mutation	Perte CHR Perte CCyR Mutation Anomalies CG associées au Ph1	Augmentation BCR-ABL Anomalies CG non associées au Ph1



La recherche d'une mutation BCR-ABL est recommandée chez les patients en réponse sub-optimale ou en échec de traitement, ainsi que lors du passage aux ITK de 2<sup>ème</sup> génération.

### **12.1.2 La polyglobulie primitive ou maladie de Vaquez**

La maladie de Vaquez ou polyglobulie primitive (polycythemia vera des anglo-saxons) est un syndrome myéloprolifératif résultant de l'expansion clonale d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente, à l'origine d'une prolifération non régulée du tissu myéloïde prédominant sur la lignée érythrocytaire.

Son incidence est faible, de l'ordre de 3 cas pour 100.000 habitants, selon une étude épidémiologique réalisée en Italie du Nord. Il s'agit d'une pathologie du sujet âgé avec un âge médian au diagnostic proche de 60 ans. Très rare avant 40 ans, elle est tout à fait exceptionnelle chez l'enfant. Le sexe ratio est voisin de 1.

La pathogénie de la maladie de Vaquez est longtemps restée inexplicée, jusqu'au printemps 2005, où plusieurs groupes de chercheurs ont décrit la présence dans les cellules myéloïdes des patients atteints, d'une mutation unique récurrente et activatrice dans le gène de la Janus Kinase JAK2. Cette mutation JAK2V617F confère aux lignées cellulaires une hypersensibilité et une indépendance vis-à-vis de diverses cytokines dont l'érythropoïétine. Retrouvée dans 95% des cas de maladie de Vaquez (et avec une fréquence moindre dans la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive), elle a ouvert la voie à un diagnostic moléculaire précis de la maladie de Vaquez. D'autres mutations plus rares de JAK2, situées dans l'exon 12, ont été retrouvées dans moins de 5% des cas de maladie de Vaquez.

La recherche de mutations de JAK2 se fait sur l'ADN extrait du sang total. En cas de recherche de mutations dans le contexte d'une maladie de Vaquez, la mutation JAK2 V617F est d'abord recherchée (95% de positivité dans les vraies maladies de Vaquez). La mutation JAK2 V617F a la particularité d'être présente à des taux très variables allant de 2 à 100%. La méthode moléculaire par discrimination allélique a été décrite dans [Blood \(X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. Blood. 2006 May 15;107\(10\):4139-41.](#) Cette méthode est très sensible et identifie tous les niveaux de mutation de JAK2 V617F. En cas de détection de cette mutation, le résultat est rendu positif associé à une estimation du taux de cette mutation (faible, intermédiaire et fort). Le niveau de mutation n'est pas associé à une valeur pronostique.

En cas de négativité, la recherche de mutations de l'exon 12 de JAK2 est réalisée. La méthode utilisée a été développée dans le laboratoire d'hématologie [PLoS One. 2010 Jan 26;5\(1\):e8893.](#)

### **12.1.3 La thrombocytémie essentielle (TE)**

La thrombocytémie essentielle est un syndrome myéloprolifératif dont l'incidence est estimée à 1,5 nouveaux cas pour 100000 habitants / an. Le nombre de patients atteints serait de 400 environ / million d'habitants (1). En l'absence de critères « pathognomoniques » de cette affection, le diagnostic de thrombocytémie essentielle s'appuie sur un ensemble de tests dont l'ordre et le choix dépendent du contexte clinique et de la complexité du diagnostic. Il faut aussi noter que le diagnostic peut se poser en urgence en cas de manifestations cliniques hémorragiques ou thrombotiques majeures. Le taux de plaquettes ne peut à lui seul distinguer une hyperplaquettose réactionnelle inflammatoire d'une vraie thrombocytémie essentielle.

Le bilan initial cherche à apporter des arguments en faveur du diagnostic de syndrome myéloprolifératif, en particulier la recherche de la mutation JAK2 V617 F qui est positive dans environ 50% des vraies thrombocytémies essentielles. Cette recherche se fait également sur le sang, de manière identique à celle décrite dans le chapitre polyglobulie primitive. En cas de négativité et dans le contexte de thrombocytémie essentielle, une recherche d'une mutation du récepteur à la thrombopoïétine, MPL W515, est réalisée sur le même échantillon d'ADN que celui utilisé pour la recherche de la mutation



JAK2 V617F. La mutation MPL W515 est retrouvée dans environ 3% des thrombocytémies essentielles. La méthode utilisée est une méthode très sensible de discrimination allélique que nous avons publiée dans le journal Human Pathology (Detection of the MPL W515L mutation in bone marrow core biopsy specimens with essential thrombocythemia using the TaqMan assay. [Hum Pathol. 2007 Oct;38\(10\):1581-2.](#)

#### ***12.1.4 La myélofibrose primitive ou splénomégalie myéloïde chronique***

La myélofibrose primitive est le plus rare des syndromes myéloprolifératifs (incidence de 3 à 7 nouveaux cas/million d'habitants/an) touchant essentiellement des sujets âgés (âge moyen au diagnostic entre 60 et 65 ans). Le bilan moléculaire cherche à apporter des arguments en faveur du diagnostic de syndrome myéloprolifératif, en particulier la présence de la mutation JAK2 V617 F qui est positive dans environ 60% des vraies splénomégalies myéloïdes. Cette recherche se fait également sur le sang. En cas de négativité et dans le contexte de splénomégalie myéloïde, une recherche d'une mutation du récepteur à la thrombopoïétine, MPL W515, est réalisée et retrouvée dans environ 10% des cas.

## **12.2 La leucémie lymphoïde chronique (LLC)**

La leucémie lymphoïde chronique est la plus fréquente des leucémies de l'adulte; son incidence annuelle est estimée à 3/100 000 habitants en Europe occidentale ; elle augmente avec l'âge. L'âge moyen au diagnostic est de 65 ans, un tiers des patients ayant moins de 55 ans.

L'évaluation pronostique conditionnant la mise sous traitement repose sur des critères cliniques, biologiques et thérapeutiques. La classification de Binet reste actuellement pertinente dans tous les cas. La grande majorité ont un stade A. Le choix thérapeutique à l'intérieur de ce groupe hétérogène, globalement de bon pronostic, est conditionnée par des résultats d'examen complémentaires comme la recherche de mutations du locus de la chaîne lourde des immunoglobulines (IGH). La mutation de ce locus signe une transformation se situant après le passage du centre germinatif au cours de l'ontogenèse lymphoïde B. L'absence de mutation suggère un événement oncogénique pré-centre germinatif. L'absence de mutations des IGH est associée à un mauvais pronostic et conduit à une prise en charge thérapeutique des LLC de stade A.

La méthode utilisée consiste en la recherche d'une population clonale des immunoglobulines suivie d'un séquençage (Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. [Leukemia 2003 vol 17 p.2257-2317, Leukemia 2007 vol 21 p.1-3.](#)

La séquence est ensuite comparée à des bases de données contenant la liste des séquences germinales identifiées chez l'homme.



## 12.3 Leucémies aiguës

### 12.3.1 Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Les LAM sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale de précurseurs myéloïdes anormaux et une altération de l'hématopoïèse normale. La classification OMS retient comme seuil l'infiltration de la moelle osseuse par plus de 20 % de blastes non lymphoïdes. L'incidence de la LAM chez l'adulte est de 5 à 8/100.000 par an en Europe ; elle augmente avec l'âge, surtout après 50 ans. Le taux de mortalité est de 4 à 6/100.000 par an. L'âge médian au diagnostic d'une LAM est de 65 ans.

Le diagnostic de LAM nécessite un examen des frottis sanguins et médullaires par des cytologistes experts. Le bilan minimal doit comporter une étude morphologique et cytochimique, un immunophénotypage, une étude cytogénétique de la moelle (caryotype et FISH) et une étude en biologie moléculaire (réarrangements géniques résultant des anomalies chromosomiques).

- **Transcrits de fusion**

La recherche de transcrits de fusion dans les LAM conditionne le pronostic et le suivi au cours de la prise en charge thérapeutique. La présence de transcrits de fusion est identifiée au caryotype et validée par biologie moléculaire (FISH ou PCR).

Des transcrits de fusion de bon pronostic sont retrouvés en particulier PML-RARA (leucémie promyélocytaire) et à un moindre degré CBFβ-MYH11 et AML1-ETO.

Des transcrits de fusion de mauvais pronostic peuvent être identifiés comme les réarrangements impliquant MLL, les transcrits de fusion CALM-AF10 et DEK-CAN.

L'analyse des transcrits est réalisée après séparation des cellules mononucléées et extraction de l'ARN ; l'ARN est ensuite converti en ADN complémentaire. Les transcrits de fusion au diagnostic sont recherchés selon le protocole européen van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert J, Delabesse E, Biondi A, Cazzaniga G, Saglio G, Gottardi E, Rambaldi A, Dotti P, Griesinger F, Parreira, Gameiro P, Gonzalez Diaz M, Malec M, Langerak AW, San Miguel JF. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 concerted action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. [Leukemia, 1999;13\(12\):1901-1928](#).

- **Mutations ponctuelles**

De nombreuses LAM n'ont pas d'anomalie détectable au caryotype (LAM à caryotype « normal ») mais présentent des mutations ayant une forte valeur pronostique comme les duplications en tandem de la tyrosine kinase FLT3 (FLT3 ITD) associées à un mauvais pronostic en l'absence de mutation concomitante de NPM1 (insertion de 4 bases au niveau de l'exon 12 de NPM1). Cette dernière mutation est de bon pronostic en l'absence de mutation de FLT3 ITD. Les mutations de CEBPA sont associées à un meilleur pronostic.

De nouvelles mutations sont caractérisées par le séquençage complet des génomes de LAM et ont des valeurs potentielles dans la prise en charge future des patients (mutations de KRAS ou de NRAS, par exemple) ou sont également associées à un mauvais pronostic comme la mutation de l'aspartate 816 de la tyrosine kinase KIT (KIT D816).

La recherche de ces mutations ponctuelles se fait sur l'ADN extrait des cellules mononucléées sur un échantillon ayant au-moins 25% de cellules blastiques. La méthode de recherche des mutations de NRAS et KRAS est actuellement publiée dans Blood (sous presse ; TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDS). [Blood. 2009 Oct 8;114\(15\):3285-91](#).

La méthode de recherche de mutations de CEBPA est celle décrite dans Nature genetics (Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, [Tenen DG. Nat Genet. 2001 Mar;27\(3\):263-70](#)).



- **Suivi moléculaire**

Une fois un transcrit de fusion identifié, l'étude de la maladie résiduelle au cours du suivi du patient peut-être réalisée sur la moelle et/ou sur le sang. Les cibles suivies par PCR quantitative sont :

- BCR-ABL1
- CBFB-MYH11
- AML1-ETO
- PML-RARA

Le suivi moléculaire est réalisé selon les mêmes modalités que celles indiquées pour le suivi moléculaire de la leucémie myéloïde chronique (Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. [Leukemia. 2003 Dec; 17\(12\): 2474-86](#); Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. [Leukemia. 2003 Dec; 17\(12\): 2318-57](#)).

### **12.3.2 Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)**

Le diagnostic de LAL nécessite l'évaluation de frottis sanguins et médullaires associés aux études de MPO, d'immuno-phénotypage, de cytogénétique et de biologie moléculaire.

- **Transcrits de fusion**

L'existence d'un chromosome de Philadelphie (Ph1) ou d'un transcrit de fusion BCR-ABL doit être connue dans les 5 premiers jours du diagnostic car elle oriente précocement la prise en charge.

Pour un patient pris en charge à visée curative, la recherche des transcrits de fusion E2A-PBX1 doit être effectuée en biologie moléculaire en cas d'échec du caryotype ou de caryotype normal dans les LAL de la lignée B, la t(1;19) pouvant être cryptique.

Pour les LAL T, une FISH ABL doit être effectuée pour ne pas méconnaître les formes avec transcrit NUP214-ABL1 pouvant éventuellement bénéficier de l'Imatinib.

- **Suivi moléculaire**

Une fois un transcrit identifié, l'étude de la maladie résiduelle au cours du suivi du patient peut-être réalisée. Le suivi de la maladie résiduelle par biologie moléculaire peut contribuer à définir les orientations thérapeutiques, en particulier l'allogreffe. Les cibles suivies par PCR quantitative sont :

- BCR-ABL1
- E2A-PBX1
- TEL-AML1
- Réarrangements des immunoglobulines et du récepteur des cellules T

Le suivi moléculaire est réalisé sur la moelle et/ou sur le sang selon les mêmes modalités que celles indiquées pour le suivi moléculaire de la leucémie myéloïde chronique (Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. [Leukemia. 2003 Dec; 17\(12\): 2474-86](#); Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. [Leukemia. 2003 Dec; 17\(12\): 2318-57](#)).



## 12.4 Syndromes lymphoprolifératifs

### 12.4.1 Le myélome multiple (MM)

Le myélome multiple est une hémopathie lymphoïde B caractérisée par l'accumulation médullaire de plasmocytes tumoraux, occasionnant fréquemment une destruction osseuse. Il s'agit de la seconde hémopathie en termes de fréquence (après les LMNH) et représente 13% des hémopathies et 1% des cancers. Le bilan biologique du myélome au diagnostic doit désormais inclure la recherche des anomalies cytogénétiques. En effet, il s'agit aujourd'hui d'un élément incontournable dans la définition du pronostic, et donc dans la mise en place de la stratégie thérapeutique du myélome multiple. Cette analyse cytogénétique est coordonnée à la tumorothèque myélome.

**Prélèvement nécessaire :** 1 tube de moelle hépariné à bouchon vert (3 à 5mL), prélevé selon la technique des quatre quadrants, accompagné d'un frottis médullaire non coloré. La qualité du prélèvement est déterminante.

**Analyses réalisées :**

Recherche par FISH (Fluorescent Hybridation In Situ) sur plasmocytes médullaires purifiés par tri immunomagnétique de la translocation (4;14), de la délétion du bras court du chromosome 17 (del(17p)), et de la translocation (14;16). Ces trois anomalies, qui touchent respectivement environ 15, 10 et 5% des patients atteints de myélome multiple, sont associées à un mauvais pronostic. Il est maintenant communément admis que les patients porteurs d'une translocation (4;14) doivent bénéficier d'un traitement incluant du Bortezomib ([Avet-Loiseau and al. JCO 2010 vol 28, p4630](#)).

Le reste des cellules (non utilisées pour les analyses cytogénétiques) sont congelées dans la tumorothèque.

Pour les patients non porteurs de ces anomalies ou qui n'auraient pas bénéficié de leur recherche au diagnostic, il est utile de refaire ces tests à la rechute ([Dimopoulos and al. Blood 2011](#)).

**Laboratoire :**

Laboratoire de cytogénétique des hémopathies du Dr Nicole Dastugue, pavillon Lefèbvre, Hôpital Purpan (responsable : Dr Jill Corre)

### 12.4.2 Etablissement de la clonalité lymphoïde

Le diagnostic d'un processus lymphomateux est le plus souvent réalisé par l'examen morphologique standard associé à un large panel d'anticorps monoclonaux. Ce diagnostic demeure dans certains cas difficile. Dans ces cas, le diagnostic de certitude passe par la mise en évidence d'une **monoclonalité des réarrangements des immunoglobulines (BCR) et du récepteur des cellules T (TCR)** par biologie moléculaire en amplifiant par PCR la région très polymorphe jonctionnelle propre à chaque lymphocyte. Dans une population de lymphocytes polyclonaux, une multitude de réarrangements différents coexiste sans qu'aucun ne prédomine. En revanche, si la population lymphocytaire est clonale, c'est toujours le même fragment qui est amplifié, ce qui se traduit par l'apparition d'un produit de PCR unique, clonal, détectable sous forme de pic. Cette technique permet aussi de comparer deux clones détectés au cours du suivi chez un même malade ou en même temps dans deux échantillons différents pour détecter, par exemple, une localisation médullaire d'un lymphome ganglionnaire, changeant le stade de la maladie et donc la prise en charge thérapeutique.

Les analyses de clonalité B et T peuvent aussi bien être réalisées à partir de liquides biologiques (sang/moelle/liquide céphalorachidien), que de **tissu congelé ou fixé**, mais il existe des impératifs de qualité de l'ADN extraits des blocs fixés et inclus en paraffine, qui doit permettre d'amplifier des fragments de taille suffisante. Certains fixateurs comme le liquide de Bouin sont, par exemple, à proscrire.



### 12.4.3 Recherche de réarrangements chromosomiques spécifiques

On sait que certains lymphomes sont associés à des réarrangements chromosomiques récurrents dont l'identification permet une classification plus précise. La mise en évidence d'un réarrangement du gène c-myc dans un lymphome B à grandes cellules (LBGC) permet d'affirmer le diagnostic de lymphome de Burkitt, car à ce jour, aucun marqueur immuno-histochimique ne permet avec certitude de retenir ce diagnostic. Or, le pronostic et la prise en charge thérapeutique sont différents de ceux d'un LBGC-NOS (sans spécificité). La réponse doit être rapide pour une prise en charge thérapeutique adéquate de ce lymphome de haut grade.

D'autres lymphomes sont caractérisés par la présence de translocations chromosomiques comme la translocation t(14;18) / IGH-BCL2, dans les lymphomes folliculaires; la translocation t(11;14) / IGH-BCL1, dans les lymphomes du manteau et les translocations impliquant le gène ALK sur le chromosome 2 dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK positifs. Leur mise en évidence peut être nécessaire pour le typage précis d'un lymphome mais permet aussi de détecter au diagnostic la maladie minime sanguine et/ou médullaire et de suivre la maladie résiduelle après traitement. Dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK positifs notamment, la détection d'une dissémination sanguine et/ou médullaire au diagnostic a une valeur pronostique péjorative.

- **Recherche de réarrangements chromosomiques par FISH interphasique**

Indications :

- recherche de réarrangement du gène c-myc dans les lymphomes de Burkitt (Myc FISH DNA probe, split signal, code No.Y5410, DAKO)
- recherche de réarrangement du gène ALK dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALK FISH DNA probe, split signal, code. Y5417, DAKO)

Conditions : tissu fixé en Formol

- **Recherche de réarrangements chromosomiques par PCR ou RT-PCR**

Indications :

- recherche de translocation t(14;18) / IGH-BCL2, dans les lymphomes folliculaires, par PCR sur ADN génomique
- recherche de translocation t(11;14) / IGH-BCL1, dans les lymphomes du manteau, par PCR sur ADN génomique
- recherche de translocation impliquant le gène ALK sur le chromosome 2 dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK positifs, par RT-PCR après extraction des ARN

Conditions :

- tissu congelé (à défaut fixé en Formol pour PCR sur ADN génomique)
- sang/moelle prélevés sur tube EDTA

Laboratoire d'Anatomie et Cytologie pathologiques du Pr Pierre BROUSSET, CHU Purpan  
Plateforme de Biologie Moléculaire labellisée par l'INCa  
**Responsable : Pr Laurence LAMANT-ROCHAIX**



## 13 TABLEAU RECAPITULATIF DES EXAMENS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE INDISPENSABLES ET UTILES A LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS

### 13.1 Examens indispensables

TUMEURS	ANOMALIES RECHERCHEES	BUT
<b>PNEUMOLOGIE</b>		
✘ Adénocarcinomes broncho-pulmonaires	Mutation exons 18 à 21 EGFR	Prescription inhibiteur tyrosine kinase de l'EGFR en première ligne chez les patients porteurs d'un carcinome non à petites cellules de stade avancé IIIB ou IV ou non opérables avec mutations activatrices d'EGFR.
<b>PATHOLOGIE DIGESTIVE</b>		
Adénocarcinome en vue d'un traitement anti-EGFR	Mutation Kras	Prescription des anti-EGFR (cetuximab/Erbitux® et panitumumab/ VECTIBIX® : prescription conditionnée par l'absence de mutation du gène K-RAS dans la tumeur).
Adénocarcinome sans polypose (syndrome HNPCC) survenant avant 60 ans ou dans un contexte d'ATCD tumoral personnel ou familial	Instabilité microsatellitaire	Sélection de patients susceptibles d'être porteurs d'un syndrome HNPCC.
Cancer gastrique ou du bas œsophage métastatique en adjonction avec une chimiothérapie en première ligne	Amplification du gène HER2	Thérapie ciblée anti-HER2 (trastuzumab / HERCEPTIN®) dans le traitement des cancers gastriques métastatiques AMM Juillet 2010)
GIST ✘	mutation des gènes KIT et PDGFRA	Diagnostic Thérapeutique (pour patients traités par imatinib)
<b>LYMPHOMES</b>		
LMNH B	Réarrangement des gènes des Ig	
LMNH T	Réarrangement des gènes du TCR	
Lymphome folliculaire	t(14;18) (q32;q21)	
Lymphome du manteau	t(11; 14)(q13;q32)	
Lymphome du Malt gastrique	t(11;18)(q21;q21)	
Lymphome de Burkitt	t(8;14) (q24 ;q32)	
✘ Lymphome anaplasique à grandes cellules	t(2;5) (p23,q35) ; inv(2)(p23,q35) ; t(2,3)(p23,q21) ; t(2,17)(p23, q11) ; t(1;2) (q25, p23) ; t(2,19)(p23, p13) ; t(2,22)(p23, q11)	
<b>SARCOMES et TUMEURS PEDIATRIQUES</b>		
Sarcome d'Ewing PNET	t(11;22) t(21;22)	
Sarcome fibromyxoïde de bas grade	t(7;16)	
Fibrosarcome infantile	t(12;15)	
Synovialosarcome	t(X;18)	
Rhabdomyosarcome alvéolaire	t(2;13), t(1;13)	Diagnostic
Sarcome à cellules claires	Transcrits de fusion EWS-ATF1	



TUMEURS	ANOMALIES RECHERCHEES	BUT
<b>SARCOMES et TUMEURS PEDIATRIQUES</b>		
Tumeur desmoplastique à cellules rondes	t(11;22)	
Liposarcome myxoïde	t(12;16)	
Chondrosarcome myxoïde	t(9;22)	
Liposarcome différencié/dédifférencié	Amplification de MDM2/CDK4	Diagnostic des liposarcomes
Histiocytofibrome angiomatoïde	Réarrangement d'EWS et TLS	
Dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand	Réarrangement de PDGFB, Fusion COL1A1-PDGFB Translocation t(17 ;22)(q22 ;q13)	Diagnostic du Dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand
Synovialosarcome	Réarrangement de SYT	Diagnostic du Synovialosarcome
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	Réarrangement d'ALK	
Fibromatose et tumeur desmoïde extra-abdominale	Mutation de $\beta$ -caténine	
Neuroblastome	Amplification N-MYC	
GIST KIT négatives ou résistantes à l'imatinib	Mutation KIT, mutation PDGF-R	Diagnostic Thérapeutique (pour patients traités par imatinib)
<b>SENOLOGIE</b>		
Carcinome infiltrant	Niveau d'amplification du gène <i>HER2</i>	Thérapeutique : thérapies ciblées anti-HER2 (trastuzumab/Herceptin®, lapatinib/TYKERB®) Pronostique : surexpression de <i>HER2</i> corrélée à un mauvais pronostic
<b>NEUROLOGIE</b>		
Tumeurs oligodendrogiales	Co-délétion 1p19q	Identifier un groupe de tumeurs cérébrales ayant un pronostic favorable



HEMOPATHIE	ANOMALIES RECHERCHEES	BUT
<b>PATHOLOGIES MYELOIDES</b>		
Leucémie myéloïde chronique	Transcrit BCR-ABL (gratuit/INCA) Mutation ABL	Prescription inhibiteur tyrosine kinase Suivi maladie résiduelle Si échec ou réponse sub-optimale pour changement d'ITK
Polyglobulie primitive (Maladie de Vaquez)	Mutation JAK2V617F (si négatif JAK2 exon 12)	Argument diagnostique
Thrombocytémie essentielle	Mutation JAK2V617F (si négatif MPLW515)	Argument diagnostique
Myélofibrose primitive	Mutation JAK2V617F (si négatif MPLW515)	Argument diagnostique
Leucémies aiguës myéloïdes	PML-RARA si t(15 ;17) CBFB-MYH11 si inv16 AML1-ETO si t(8 ;21) BCR-ABL si t(9;22)  Mutations FLT3ITD, NPM1, CEBPA	Diagnostic et prise en charge thérapeutique Suivi de maladie résiduelle  Pronostic pour prise en charge thérapeutique
<b>PATHOLOGIES LYMPHOÏDES</b>		
Leucémies aiguës lymphoblastiques	BCR-ABL si t(9 ;22)  MLL-AF4 si t(4 ;11) E2A-PBX si t(1 ;19) TEL-AML1 si t(12;21)  Maladie résiduelle Ig/TCR	Diagnostic et prise en charge thérapeutique Suivi de maladie résiduelle  Diagnostic et suivi de maladie résiduelle  Pronostic pour prise en charge thérapeutique
Leucémie lymphoïde chronique	Statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines	Pronostic pour prise en charge thérapeutique
Myélome	Délétion 17p/p53 t(4;14)/FGFR3-IgH t(14;16)/MAF	Pronostic pour prise en charge thérapeutique



## 13.2 Examens utiles

TUMEURS	ANOMALIES RECHERCHEES	BUT
<b>PNEUMOLOGIE</b> ✖		
Adénocarcinome broncho-pulmonaire	Mutation exon 18 à 21 EGFR Translocation EML4-ALK1 Mutation des gènes KRAS, BRAF , HER2 et PI3KCA	Sélection des patients pouvant tirer le meilleur bénéfice des inhibiteurs de Tyrosine kinase de l'EGFR (adénocarcinomes métastatiques).
<b>PATHOLOGIE DIGESTIVE</b>		
GIST	mutation des gènes KIT et PDGFRA	Adaptation thérapeutique (en traitement adjuvant)
<b>GYNECOLOGIE</b>		
Col : virus HPV	Présence du virus HPV	Dépistage du virus HPV
Cancer de l'ovaire chez les patientes de moins de 70 ans	Mutation BRCA1 ou BRCA2	Sélection de patientes porteuses de mutations
<b>LYMPHOMES</b>		
Hodgkin		
LMNH B	Réarrangement des gènes des Ig	
LMNH T	Réarrangement des gènes du TCR	
Lymphome folliculaire	t(14;18) (q32;q21)	
Lymphome du manteau	t(11; 14)(q13;q32)	
Lymphome du Malt gastrique	t(11;18)(q21;q21)	
Lymphome de Burkitt	t(8;14) (q24 ;q32)	
Lymphome anaplasique à grandes cellules	t(2;5) t(1;2)	
<b>MYELOME (prélèvement médullaire)</b>		
	Délétion 13q14 Délétion 17p/p53 t(4;14)/FGFR3-IgH	Pronostic
	Autres anomalies chromosomiques cytogénétiquement détectables : t(11;14), hyperdiploïdie	Pronostic
<b>SARCOMES et TUMEURS PEDIATRIQUES</b>		
Sarcome d'Ewing PNET	t(11;22) t(21;22)	
Sarcome fibromyxoïde de bas grade	t(7;16)	
Fibrosarcome infantile	t(12;15)	
Synoviosarcome	t(X;18)	
Rhabdomyosarcome alvéolaire	t(2;13) t(1;13)	
Tumeur desmoplastique à cellules rondes	t(11;22)	
Liposarcome myxoïde	t(12;16)	
Chondrosarcome myxoïde	t(9;22)	
Neuroblastome	Amplification N-MYC	
GIST KIT négatives ou résistantes à l'inatinib	Mutation KIT, mutation PDGF-R	
<b>SENOLOGIE</b> ✖		
Carcinome sécrétoire	Réarrangement ETV6	Utile au diagnostic
Cancer du sein métastatique	Amplification FGFR1 et FGFR2	Thérapeutique ; essais cliniques anti-FGFR
<b>NEUROLOGIE</b>		
Glioblastomes	Méthylation du gène MGMT	Délimitation d'un groupe de patients à réponse thérapeutique favorable ; facteur pronostique probable
<b>MELANOMES</b> ✖		
Mélanomes	Recherche de mutation BRAF et C-Kit	Prescription d'inhibiteurs de BRAF Prescription d'inhibiteurs de Kit