

FICHE D'INFORMATIONS PRATIQUES

HOPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE (BICHAT - LOUIS MOURIER - BEAUJON -BRETONNEAU - RICHT)

46, RUE HENRI HUCHARD, 75877 PARIS Cedex 18

STANDARD : 01 40 25 80 80 INTERNATIONAL : 331 40 25 83 05

DEPARTEMENT DE GENETIQUE (Pr B.GRANDCHAMP) - CONTACT : DR N. THEOU-ANTON - DR J.LAMORIL - Pr. N. SOUFIR
TEL SECRETARIAT : 01 40 25 88 51/FAX : 01.40.25.87.85

DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE (Pr. P. BEDOSSA) - CONTACT : DR.A COUVELARD (BICHAT - TEL : 01 40 25 80 03) - DR
N.GUEDJ (BEAUJON - TEL : 01 40 87 54 59) - DR M.GROSSIN (LOUIS MOURIER - TEL : 01 47 60 62 61)

Informations pratiques concernant la recherche du statut mutationnel de BRAF, NRAS et C-KIT dans les mélanomes

Pour quels patients :

Patients atteints de mélanome.

Des informations complémentaires sont disponibles sur la fiche médicale « Peau/ Mélanome malin (SAI)/Mutation » de l'AP-HP.

Dans quels buts :

- Définir l'éligibilité à un traitement ciblé par le Vémurafénib (inhibiteur de BRAF)
- Définir l'éligibilité à de nouveaux traitements ciblés (inhibiteurs de NRAS ou d'autres molécules de la voie MAP kinase, PI3 kinase ou d'autres voies métaboliques impliquées dans le mélanome).
- Dans le cas de mélanome acral ou muqueux, une mutation activatrice peut être retrouvée dans le gène C-KIT (exons 9, 11, 13 et 17). La recherche de mutations dans ces régions du gène permet de définir l'éligibilité à un traitement ciblé par l'imatinib, le sunitinib, nilotinib ou le dasatinib.

Sur quels prélèvements :

Tumeur primitive ou localisation métastatique **fixée** (préférentiellement formol tamponné, le liquide de Bouin est formellement exclu) et incluse en paraffine (10 coupes de 10 microns) **ou tumeur congelée** (10 coupes de 10 microns en cryotube).

Envoyer soit des copeaux (dans un tube eppendorf) soit des lames blanches (5-10 lames et une lame avec coloration HPS annotée).

En cas de tumeur congelée, envoyer dans de la carboglace ou l'azote.

Le prélèvement doit comporter **plus de 30%** de cellules tumorales (par rapport au nombre total de cellules du prélèvement). Cette donnée chiffrée doit être indiquée dans la fiche de prescription pour une interprétation pertinente des résultats.

Où adresser sa demande :

Votre demande sera traitée à l'hôpital Bichat pour l'analyse moléculaire après envoi par le service d'anatomie pathologique de l'hôpital où sera réceptionné, validé et préparé l'échantillon (Bichat, Beaujon ou Louis Mourier).

➔ Le prélèvement sera initialement réceptionné, validé et préparé pour l'analyse moléculaire par le laboratoire d'anatomie pathologique :

Département d'Anatomie Pathologique – Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine	
HOPITAL BEAUJON	HOPITAL BICHAT
Référent : Dr N. GUEDJ 100, boulevard du Général Leclerc 92110 Clichy Réception : 01 40 87 54 59	Référent : Dr L.DESCHAMPS – Dr E. MARINHO 46 rue Henri Huchard 75018 Paris Réception : 01 40 25 80 03

➔ Les coupes de tissus seront ensuite adressées, par l'anatomopathologiste du groupe hospitalier au correspondant biologiste moléculaire du département de Génétique Moléculaire qui réalise l'extraction de l'ADN, l'analyse moléculaire et son interprétation :

Référents : [Dr Nathalie Théou-Anton \(nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr\)](mailto:nathalie.theou-anton@bjn.aphp.fr)
[Dr Jérôme Lamoril \(jerome.lamoril@bch.aphp.fr\)](mailto:jerome.lamoril@bch.aphp.fr)
[Pr Nadem Soufir \(nadem.soufir@bch.aphp.fr\)](mailto:nadem.soufir@bch.aphp.fr)

Laboratoire : Département de Génétique Moléculaire
 Hôpital Bichat
 46 rue Henri Huchard
 75877 Paris cedex 18
 Réception: 01.40.25.88.51 / fax 01.40.25.87.85

Que faut-il envoyer :

➔ **Si envoi des blocs directement à un service d'anatomie pathologique des Hôpitaux Universitaires Paris Nord Val de Seine**

- Le bloc tumoral le plus riche en cellules tumorales (par rapport aux cellules totales de l'échantillon)
- Le **compte rendu d'anatomopathologie** correspondant au prélèvement
- Le **Bon de demande d'examen** (téléchargeable sur le site) dûment rempli, comportant notamment les coordonnées complètes des correspondants pour leur assurer une bonne transmission des résultats.

Le laboratoire d'anatomie pathologique transmet au Département de Génétique Moléculaire, une copie du dossier administratif et les copeaux du prélèvement dûment identifié pour analyse.

➔ **Si envoi des copeaux (ou lames) du prélèvement directement au département de Génétique Moléculaire :**

- le **Bon de demande d'examen** (téléchargeable sur le site) dûment rempli, comportant notamment les **coordonnées complètes des correspondants** pour leur assurer une bonne transmission des résultats.
- le **compte rendu d'anatomo pathologie** correspondant au prélèvement
- Les **copeaux (ou lames) du prélèvement** dûment identifié pour analyse
- la **fiche de dédommagement** pour désarchivage, le cas échéant.

Quel est le délai de rendu de l'analyse ?

A partir de la réception du prélèvement au laboratoire de génétique, un délai maximum de **15 jours** est à prévoir. Le résultat est adressé aux correspondants qui seront mentionnés dans le Bon de demande d'examen. Le résultat est signé par les référents biologistes moléculaires.

En cas de situation d'urgence, la mention **URGENT** sur le Bon de demande d'examen permet de réduire le délai de rendu au maximum.

Le bloc tumoral vous sera ré adressé secondairement par le service d'anatomie pathologique.

Quelles techniques utilisons-nous ?

→ Au service d'anatomie pathologique :

- le bloc tumoral sera coupé et analysé en HES pour sélection de la zone la plus richement tumorale (la richesse tumorale pourra être augmentée par macrodissection).
- faire 10 coupes de 10 µm soit sur lames (+1HPS annoté) soit en copeaux dans un tube et transmettre au laboratoire de génétique moléculaire

→ Au service de génétique moléculaire:

- L'extraction de l'ADN à partir des coupes tissulaires est réalisée.
- L'analyse moléculaire se fait par différentes techniques :
 - Génotypage V600 (gène BRAF) :
 - PCR LNA spécifique d'allèle
 - PCR-HRM (High Resolution Melting) de l'exon 15 du gène BRAF sur LightCycler 480 suivi le cas échéant, du séquençage sur ABI 3130 (Applied Biosystems).
 - Analyse des exons 2 et 3 (dont les codons 12, 13 et 61) du gène codant pour NRAS
 - PCR-HRM (High Resolution Melting) sur LightCycler 480 suivi le cas échéant, du séquençage sur ABI 3130 (Applied Biosystems).
 - Analyse des mutations du gène codant pour cKIT
 - Séquençage des exons 9, 11, 13 et 17.