

Évaluation de huit analyses pour la mise
à jour du *Répertoire québécois et système
de mesure des procédures de biologie
médicale*

Une production de l'Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux (INESSS)

Direction des services de santé et de
l'évaluation des technologies

Évaluation de huit analyses pour la mise
à jour du *Répertoire québécois et système
de mesure des procédures de biologie
médicale*

Le présent avis est produit par l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) qui assume l'entière responsabilité de sa forme et de son contenu définitifs.

Chaque analyse a été évaluée avec une approche méthodologique qui prend en considération, notamment, les facteurs suivants :

- la pertinence clinique;
- la valeur diagnostique;
- la valeur pronostique;
- la validité analytique;
- les conséquences prévisibles sur les ressources du système de santé et de services sociaux de l'introduction de l'analyse au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*.

Membres de l'équipe projet

Professionnels scientifiques

Simon Bélanger, M. Sc., MBA
Anne Bergeron, Ph. D.
Frédéric Breton, B. Sc.
Annie Dubé, Ph. D.
Andrée Fortin, Ph. D.
Catherine Gravel, M. Sc.
Phuong Hua, M. Sc.
Éléna Morarescu, M. Sc.
Geneviève Morrow, Ph. D.
Emmanuelle Tchekanda, Ph. D.

Coordonnateur scientifique

Éric Potvin, Ph. D.

Adjoint à la direction

Michel LeBrun MBA, Ph. D.

Directrice

Michèle de Guise, M.D., FRCPC

Repérage d'information scientifique et soutien documentaire

Caroline Dion, M.B.S.I., *bibl.prof.*
Mathieu Plamondon, M.S.I.

Soutien administratif

Annabelle Suire

Équipe de l'édition

Patricia Labelle
Denis Santerre
Hélène St-Hilaire

Sous la coordination de

Renée Latulippe, M.A.

Avec la collaboration de

Carole Saint-Père, révision linguistique

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2019

Bibliothèque et Archives Canada, 2019

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF)

ISBN 978-2-550-83963-7 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2019

La reproduction totale ou partielle de ce document est autorisée à condition que la source soit mentionnée.

Pour citer ce document : Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Évaluation de huit analyses pour la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Québec, Qc : INESSS; 2019. 222 p.

L'Institut remercie les membres de son personnel qui ont contribué à l'élaboration du présent document.

Responsabilité

L'Institut assume l'entière responsabilité de la forme et du contenu définitifs du présent document. Les conclusions ne reflètent pas forcément les opinions des personnes consultées dans le cadre de ce dossier.

Déclaration d'intérêts

Tous les membres du comité scientifique ont rempli un formulaire de déclaration d'intérêts. Les conflits potentiels sont indiqués à la section 1 *Information générale* de chacun des avis (encadré).

COMITÉ SCIENTIFIQUE – ANALYSES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Président

François Rousseau, M.D., M. Sc., FRCPC

Médecin biochimiste, CHU de Québec – Université Laval.

Vice-président

Lambert Busque, M.D., FRCPC

Hématologue, CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal.

Membres

Lorraine Caron, Ph. D.

Consultante en éthique

Guy Fink, Ph. D.

Biochimiste clinique, CIUSSS de l'Estrie – Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke.

Louis Gaboury, M.D., Ph. D., FRCPC

Anatomo-pathologiste, Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

David Rosenblatt, M.D., FRCPC

Pédiatre, généticien, Centre universitaire de santé McGill.

Cédric Yansouni, M.D. FRCPC, DTM&H

Microbiologiste infectiologue, Centre universitaire de santé McGill.

Membre citoyen

Suzanne K. Bédard

SYNTHÈSE DES RECOMMANDATIONS

Titre des analyses	Recommandation de l'INESSS
Analyse d' <i>ALK</i> par immunohistochimie.	Introduction de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> .
Analyse d' <i>ALK</i> par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.	Introduction conditionnelle de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> . (Validation incomplète).
Détection de mutations du gène <i>KRAS</i> par TAAN.	Validation analytique incomplète.
Détection de mutations du gène <i>NRAS</i> par TAAN.	Validation analytique incomplète.
Séquençage de nouvelle génération des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i> .	Introduction conditionnelle de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> . (Validation incomplète).
Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG.	Introduction de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> .
Analyse de <i>ROS1</i> par immunohistochimie.	Introduction conditionnelle de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> .
Analyse de <i>ROS1</i> par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.	Introduction conditionnelle de l'analyse dans le <i>Répertoire</i> .

LISTE DES ANALYSES

ANALYSE ALK-IHC (RÉFÉRENCE – 2018.03.006V)	1
ANALYSE ALK-FISH (RÉFÉRENCE – 2018.03.007V)	16
DÉTECTION DE MUTATIONS DU GÈNE <i>KRAS</i> PAR TAAN (RÉFÉRENCE – 2018.03.004V)	34
DÉTECTION DE MUTATIONS DU GÈNE <i>NRAS</i> PAR TAAN (RÉFÉRENCE – 2018.03.005V)	56
SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION DES GÈNES <i>F8</i> et <i>VWF</i> (RÉFÉRENCE – 2018.03.008).....	71
ANALYSE DES TRANSLOCATIONS DES SARCOMES DES TISSUS MOUS ET OSSEUX PAR SNG (RÉFÉRENCE – 2018.01.001).....	109
ANALYSE DE <i>ROS1</i> PAR IMMUNOHISTOCHIMIE (IHC) (RÉFÉRENCE - 2018.02.001).....	190
ANALYSE DE <i>ROS1</i> PAR HYBRIDATION <i>IN SITU</i> EN FLUORESCENCE (FISH) (RÉFÉRENCE – 2018.03.002).....	207

Analyse d'*ALK* par immunohistochimie (RÉFÉRENCE – 2018.03.006V)

Avis d'évaluation

(Désignation complémentaire)

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Institut universitaire de cardiologie et pneumologie de Québec – Université Laval

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Tous les membres du comité présents à la rencontre ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

2. RÉSUMÉ

	Analyse d'ALK par immunohistochimie (IHC)
Demandeur	Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval.
Nom et objectif de l'analyse	Détecter l'expression de la protéine ALK dans les biopsies de cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) métastatiques par IHC, dans le but d'ajouter la thérapie ciblée au plan de traitement.
Situation actuelle	Cette analyse est déjà réalisée au Québec depuis quelques années. Toutefois, elle n'a pas de code unique dans le <i>Répertoire</i> .
Nombre d'analyses prévues	Le centre demandeur estime devoir effectuer environ 1 640 analyses d'IHC pour ALK annuellement.
Valeur thérapeutique	La thérapie associée à l'analyse évaluée prolonge la survie médiane sans progression de 3,9 mois comparativement aux chimiothérapies administrées. Elle permettrait à une proportion significative de patients d'obtenir une réponse tumorale objective comparativement aux chimiothérapies. De plus, la durée médiane de cette réponse semble en faveur du traitement.
Validité analytique	L'analyse par IHC montre une concordance de 100 % avec l'analyse par FISH utilisée comme référence.
Impact budgétaire	L'ajout de cette analyse au <i>Répertoire</i> pourrait générer une réduction de coût d'environ 4 000 \$ à 4 500 \$ par année pour les besoins actuels de l'IUCPQ.
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	Le guide de pratique clinique publié conjointement par le CAP, l'IASLC et l'AMP ainsi que les lignes directrices de l'ASCO recommandent l'utilisation de l'IHC comme alternative au FISH pour l'analyse d'ALK. Le NCCN recommande l'analyse d'ALK sans spécifier la méthode à privilégier. Le LCC recommande l'analyse par IHC suivie d'une confirmation par FISH pour les résultats équivoques.
Enjeux particuliers	L'attribution d'un code spécifique à l'IHC pour ALK dans le <i>Répertoire</i> permettrait un suivi de la volumétrie, à ce jour impossible pour cette analyse.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

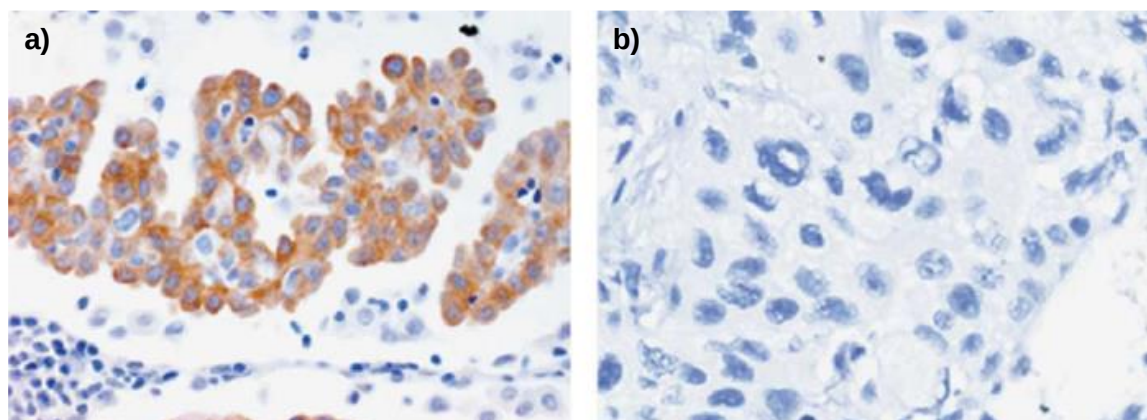
3.1. Nom et objectifs de l'analyse

ALK-IHC

Détecter les réarrangements du gène *Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK) en analysant l'expression de la protéine ALK dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) métastatiques par immunohistochimie (IHC), dans le but d'ajouter une thérapie ciblée au plan de traitement.

3.2. Description de la méthode

L'IHC permet d'évaluer qualitativement l'intensité du marquage généré par l'anticorps dirigé contre la protéine ALK. Typiquement, une IHC positive montre une coloration cytoplasmique (figure 1a).



Source : Selinger *et al.*, 2013.

Figure 1 Exemples de marquage de la protéine ALK par IHC. a) réarrangement positif (surexpression protéique), b) pas de réarrangement (expression normale).

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Le prélèvement de la biopsie et la préparation des échantillons (fixation des spécimens au formaldéhyde et inclusion en paraffine) seront effectués par les laboratoires des centres référents. Par la suite, les échantillons seront acheminés au laboratoire d'anatomopathologie et de cytologie de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval, où des lames seront produites pour l'analyse d'ALK en IHC. Le résultat sera interprété par une équipe de cinq anatomopathologistes spécialisés en pathologie pulmonaire.

Les résultats relatifs à l'ALK seront colligés dans un rapport incluant les biomarqueurs EGFR et PD-L1 faisant partie du même algorithme (annexe A). Le rapport d'analyses sera ensuite acheminé au clinicien requérant. Le délai cible préconisé par les guides de pratique clinique [Lindeman *et al.*, 2018] pour cette analyse est de 10 jours ouvrables, mais étant donné l'état clinique de certains patients, le demandeur prévoit un délai de réponse plus court, soit de 4 jours ouvrables.

3.4. Société ou concepteur

Le demandeur utilise l'anticorps monoclonal ALK (clone 5A4) de la compagnie Biocare Medical et la trousse de détection EnVision FLEX de la compagnie Agilent Technologies (Dako).

3.5. Homologation

L'anticorps monoclonal ALK (clone 5A4) de la compagnie Biocare Medical, utilisé pour l'IHC, a été homologué par Santé Canada le 28 novembre 2012 (no. 90209). La trousse de détection EnVision FLEX de la compagnie Agilent Technologies (Dako) a été homologuée par Santé Canada le 26 mars 2009 (no. 79381).

3.6. Valeur pondérée : 17,21

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé ou métastatique.

4.2. Description de la maladie visée

Données sociodémographiques

Le cancer du poumon représente le deuxième type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes et chez les hommes, ainsi que la première cause de décès par cancer au Québec. En 2017, il a été estimé que 8 700 nouveaux cas de cancer du poumon ont été diagnostiqués et que 6 700 personnes sont décédées des suites de cette maladie. Plus spécifiquement, le CPNPC représente environ 85 % des cas de cancer du poumon. La majorité des patients atteints d'un CPNPC à un stade localement avancé ou métastatique ne sont pas admissibles à la chirurgie et le pronostic de survie à 5 ans varie de 1 à 7 %¹.

Altérations géniques

Le gène *ALK* fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Chez certains patients atteints de CPNPC, une translocation dans le gène *ALK* est observée. Ce réarrangement est responsable de l'activité tyrosine kinase constitutive, qui favorise la prolifération cellulaire tumorale [Soda *et al.*, 2007]. On estime qu'environ 2,5 % des CPNPC avec composante d'adénocarcinome présentent des réarrangements du gène *ALK* dans la population canadienne [Cutz *et al.*, 2014].

D'autres altérations géniques (mutations somatiques, mutations affectant l'expression protéique, réarrangements géniques) ont été décelées chez les patients souffrant de CPNPC [CGARN, 2014]. Certaines d'entre elles sont associées à des biomarqueurs et permettent aux patients de bénéficier de thérapies ciblées. Les altérations pour lesquelles il existe une thérapie ciblée sont mentionnées dans le tableau 1.

¹ Extrait tiré et adapté de : Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules [INESSS, 2017].

Tableau 1 Biomarqueurs moléculaires du cancer du poumon non à petites cellules et thérapies associées

BIOMARQUEUR	ALTÉRATION	FRÉQUENCE (%)	THÉRAPIE APPROUVÉE	
			SANTÉ CANADA	QUÉBEC
EGFR	Mutations L858R et del19	10-15 %	géfitinib, afatinib	géfitinib afatinib
EGFR	Mutation T790M	60 % patients dont la maladie a progressé sur anti-EGFR	osimertinib	osimertinib
ALK	Réarrangements géniques	3-5 %	crizotinib, alectinib, céritinib, brigatinib	crizotinib, céritinib
PD-L1	Proportion des cellules cancéreuses exprimant la protéine PD-L1	≥ 50 % cellules : 28-30 % 1-49 % des cellules : 38 % < 1 % des cellules : 34 %	pembrolizumab	pembrolizumab
BRAF	Mutation V600	1-2 % des adénocarcinomes	dabrafénib + tramétinib	

Sources : NCCN, 2018; Herbst *et al.*, 2016; Reck *et al.*, 2016 et les données de l'INESSS.

Abréviations : ALK : *Anaplastic Lymphoma Kinase*; BRAF : *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma B*; EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*; PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*.

Thérapies non ciblées²

Le traitement de première intention pour les patients atteints de CPNPC de stade avancé ou métastatique sans réarrangements du gène *ALK* consiste en l'association d'une platine (cisplatine ou carboplatine) au pémétrexed (Alimta^{MC}) ou à la gemcitabine (Gemzar^{MC} et versions génériques).

Thérapie ciblée

Le traitement de première intention pour les patients présentant des réarrangements du gène *ALK* est le crizotinib (Xalkori^{MC}), un inhibiteur sélectif du récepteur tyrosine kinase de la protéine *ALK* et de ses variantes oncogènes. Le céritinib est un autre inhibiteur sélectif du récepteur tyrosine kinase de la protéine *ALK* qui est prescrit en deuxième intention chez les patients présentant un échec de traitement au crizotinib. Ces inhibiteurs ont une activité antinéoplasique sur les tumeurs présentant un réarrangement du gène *ALK*.

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Du 1^{er} janvier au 27 novembre 2017 (331 jours), le laboratoire de l'IUCPQ a réalisé 1 486 analyses d'*ALK* par IHC. Selon ces données, on estime à 1 640 le nombre annuel de ces analyses dans la population desservie par le centre demandeur.

² Extrait tiré de : Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments [INESSS, 2015].

4.4. Situation actuelle

L'analyse de l'expression de la protéine ALK par IHC est un test déjà réalisé dans le laboratoire du centre demandeur ainsi que dans d'autres centres québécois depuis quelques années. Toutefois, la détection d'ALK par IHC ne possède actuellement pas de code unique dans le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS), ci-après nommé *Répertoire*.

4.5. Données médico administratives

Le laboratoire du centre demandeur confirme qu'il utilise le code 60151 pour la détection d'ALK par IHC (tableau 2).

Tableau 2 Codes présentement inscrits dans le *Répertoire*

CODE	DESCRIPTION	VP
60151	Immunohisto/cytochimie (immunohistochimie) (contrôles inclus) : utiliser ce code pour tous les anticorps, excepté ceux qui ont un but thérapeutique ou pronostique (ER, PR, ALK, ERBB2, etc. : codes 60189 et 60570)	19,7
60189	Biomarqueurs immunohistochimiques (à but thérapeutique : ALK, EGFR, ER, KI67, MSH1, MSH2, MSH6, PMS2, PR, KIT [CD117] (par marqueur, incluant le décompte)	1,0

Source : Données du MSSS.

Abréviation : VP : Valeur pondérée.

4.6. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, cette nouvelle analyse répond à un besoin clinique qui n'est pas couvert actuellement. Les avantages de l'analyse proposée sont :

- Détecter les patients atteints d'un CPNPC métastatique ALK-positif leur permettant d'avoir accès à une thérapie ciblée;
- Offrir des analyses dont le protocole est déjà optimisé et validé;
- Offrir un court délai de réponse : possibilité de remettre les résultats de l'IHC en 24 heures.

4.7. Assurance qualité

Le laboratoire du centre demandeur participe aux contrôles de qualité externe du College of American Pathologists (CAP) et du Contrôle Canadien de la Qualité en Immunohistochimie (cIQc).

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif d'établir ou de préciser un diagnostic.

5.2. Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

5.3. Valeur thérapeutique

La valeur thérapeutique du crizotinib a été reconnue par l'INESSS chez les patients ALK-positifs suite à l'analyse de l'étude PROFILE 1014 [Solomon *et al.*, 2014]. Cette étude comparait le crizotinib à une chimiothérapie à base de sels de platine chez 343 adultes atteints d'un CPNPC localement avancé, récurrent ou métastatique, présentant des réarrangements du gène *ALK*.

Les résultats de l'étude démontrent que le crizotinib prolonge significativement la survie médiane sans progression de 3,9 mois comparativement aux chimiothérapies administrées. Le crizotinib permettrait à une proportion significative de patients d'obtenir une réponse tumorale objective comparativement aux chimiothérapies. De plus, la durée médiane de cette réponse semble en faveur du traitement par la thérapie ciblée (tableau 3).

Tableau 3 Principaux résultats d'efficacité de l'étude PROFILE 1014

PARAMÈTRES D'EFFICACITÉ	CRIZOTINIB (n = 172)	CHIMIOTHÉRAPIE (n = 171)	RRI (IC 95 %) VALEUR p
Survie médiane sans progression	10,9 mois	7 mois	0,45 (0,35 à 0,60) p < 0,001
Réponse tumorale objective (% patients)	74 %	45 %	p < 0,001
Durée médiane de la réponse tumorale	11,3 mois	5,3 mois	Non disponible

Source : Tableau tiré et adapté de Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments [INESSS, 2015].

Abréviations : IC : Intervalle de confiance; RRI : Rapport des risques instantanés (*hazard ratio*).

Enfin, l'évaluation de la qualité de vie par des instruments de mesure validés montre que le crizotinib améliore de façon significative la qualité de vie des patients comparativement à la chimiothérapie. Le crizotinib réduit les symptômes associés à la maladie, dont la douleur, la toux et la dyspnée.

5.4. Validité analytique

Sept études rapportant les performances analytiques de l'IHC réalisée avec l'anticorps ALK (clone 5A4) ayant comme standard de référence le FISH ont été sélectionnées (tableau 4). Une concordance de 100 % est observée.

Tableau 4 Performance de l'IHC réalisée avec l'anticorps ALK (clone 5A4) ayant comme standard de référence le FISH

ÉTUDE	NOMBRE DE CAS ANALYSÉS	PERFORMANCE ANALYTIQUE DE L'IHC (FISH COMME STANDARD DE RÉFÉRENCE)			
		SENSIBILITÉ	SPÉCIFICITÉ	VPP	VPN
Cutz <i>et al.</i> , 2014	411	100	100	s. o.	s. o.
McLeer-Florin <i>et al.</i> , 2012	100	95	100	s. o.	s. o.
Paik <i>et al.</i> , 2011	465	100	98	s. o.	s. o.
Park <i>et al.</i> , 2012	262	100	98	s. o.	s. o.
Savic <i>et al.</i> , 2013	40	93	96	93	96
Selinger <i>et al.</i> , 2013	594	93	100	s. o.	s. o.
Sholl <i>et al.</i> , 2013	186	100	98	s. o.	s. o.

Abréviations : IHC : Immunohistochimie, FISH : Hybridation in situ en fluorescence (FISH, de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*); s. o. : Sans objet; VPP : Valeur prédictive positive; VPN : Valeur prédictive négative.

La sensibilité de l'IHC avec le clone 5A4 se situe entre 93 et 100 % et la spécificité entre 96 et 100 %. Considérant l'étude qui a fourni des valeurs prédictives, la valeur prédictive positive est de 93 % et la valeur prédictive négative de 96 %.

5.5. Données fournies par le demandeur

Étude CALK

Le centre demandeur a participé à l'étude pancanadienne multicentrique CALK (*Canadian Anaplastic Lymphoma Kinase*) [Cutz *et al.*, 2014]. Cette étude avait comme objectif de développer une méthode standardisée et optimisée afin de favoriser l'implantation de la détection et de la confirmation des réarrangements du gène *ALK* dans les laboratoires canadiens.

Parmi les 13 laboratoires ayant participé au processus de standardisation et d'optimisation des protocoles d'IHC et de FISH, trois ont aussi été impliqués dans une phase prospective. Cette phase consistait à valider les protocoles d'IHC et de FISH préalablement mis au point avec 411 échantillons. L'anticorps ALK (clone 5A4) a été utilisé pour l'IHC. Les résultats de performance analytique de l'analyse par IHC ayant comme référence le FISH sont présentés plus haut dans le tableau 4, soit une sensibilité (IC 95 % : 81,5-100,0) et une spécificité (IC 95 % : 99,0-100,0) de 100 %.

Données de validation du demandeur

Le demandeur affirme que les protocoles validés dans l'étude CALK pour la détection de la surexpression de la protéine ALK et la confirmation des cas positifs ou équivoques par FISH sont ceux utilisés actuellement dans son laboratoire. Les données de validation du demandeur concernant l'IHC incluses dans l'étude CALK sont présentées à la figure 2.

Table 1. CALK IUCPQ IHC results (ALK clone 5A4).			
Sample	Reference	IUCPQ (H12-40029)	Comments
CALK-01	+	+	None
CALK-02	+	+	None
CALK-03	-	-	None
CALK-04	+	+	None
CALK-05	+	+	None
CALK-06	+	+	None
CALK-07	+	+	None
CALK-08	+	+	None
CALK-09	-	-	None
CALK-10	+	+	None
CALK-11	-	-	None
CALK-12	+	+	None
CALK-13	-	-	None
CALK-14	-	-	None
CALK-15	+	+	None
CALK-16	+	+	None
CALK-17	+	+	None
CALK-18	+	+	None
CALK-19	+	+	None
CALK-20	+	+	None
CALK-21	+	+	Pale staining; D5F3(+)
CALK-22	+	+	None
CALK-23	-	-	None
CALK-24	-	-	None
CALK-25	+	+	Pale staining; D5F3(+)
CALK-26	+	+	None
CALK-27	+	+	None
CALK-28	+	+	None
N6	-	-	None
N7	-	-	None
N8	-	-	None
N9	-	-	None
N10	-	-	None

Sensitivity	21/21	100%
Specificity	7/7	100%
PPV	21/21	100%
NPV	7/7	100%

Note 1. CALK-01 to CALK-28: CALK study cases.

Note 2. N6 to N10: CALK normal tissue negative controls.

Figure 2 Données de concordance entre l'IHC réalisée avec l'anticorps 5A4 et une analyse de référence par FISH.

Les résultats obtenus par le laboratoire du demandeur avec l'anticorps ALK 5A4 dans le cadre de l'étude CALK montrent une sensibilité, une spécificité, ainsi qu'une valeur prédictive positive et négative de 100 %. Deux cas (échantillons CALK-21 et CALK-25) dont les résultats se sont avérés équivoques avec l'anticorps 5A4 ont été confirmés avec l'anticorps D5F3.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse permettant de détecter par IHC une surexpression de la protéine ALK chez les patients atteints de CPNPC métastatique. Cette analyse a pour objectif de détecter les tumeurs présentant un réarrangement du gène *ALK* en vue de l'utilisation d'une thérapie ciblée avec un inhibiteur de tyrosine kinase, le crizotinib. Les coûts liés à l'IHC sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective du MSSS. L'analyse d'impact budgétaire repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans le tableau 5. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- Du 1^{er} janvier au 27 novembre 2017 (331 jours), le laboratoire du CHU de Québec, site IUCPQ, a réalisé 1 486 analyses d'ALK par IHC. En se basant sur ces données, le demandeur anticipe que l'analyse serait réalisée sur 1 640, 1 738 et 1 842 échantillons au cours de chacune des trois prochaines années, respectivement.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur pour l'analyse d'ALK par IHC est de 17,21. Actuellement, le demandeur utilise le code 60151 figurant au *Répertoire* pour l'analyse d'ALK par IHC. La valeur pondérée est de 19,7.
- Les coûts relatifs aux traitements ne sont pas pris en compte dans cet avis puisque les patients atteints de CPNPC métastatique bénéficient déjà du dépistage d'ALK et ont donc déjà accès à la thérapie ciblée. Seuls les coûts liés aux analyses d'ALK en IHC seront considérés.

Tableau 5 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* des analyses permettant de détecter la surexpression de la protéine ALK par IHC dans les CPNPC métastatiques au CHU de Québec, site IUCPQ

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : Sans l'ajout de l'analyse ALK-IHC				
Analyses ALK-IHC	1 640	1 738	1 842	5 220
Coûts	32 308 \$	34 239 \$	36 287 \$	102 834 \$
Nouveau scénario : Avec l'ajout de l'analyse ALK-IHC				
Analyses ALK-IHC	1 640	1 738	1 842	5 220
Coûts	28 224 \$	29 911 \$	31 701 \$	89 836 \$
Impact net	-4 084 \$	-4 328 \$	-4 586 \$	-12 998 \$
Analyses de sensibilité*	Pour 3 ans, réduction de coût la plus élevée			-14 298 \$
	Pour 3 ans, réduction de coût la plus faible			-11 700 \$

* Les coûts présentés en analyses de sensibilité considèrent une variation du nombre d'analyses de 10 %.

Ainsi, l'ajout de l'analyse permettant de détecter la surexpression de la protéine ALK par IHC dans les CPNPC métastatiques pourrait générer une réduction de coût d'environ 4 000 \$ à 4 500 \$ par année pour les besoins actuels de l'IUCPQ. Cela est attribuable à une diminution de la valeur pondérée par rapport à la situation actuelle.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Enjeu administratif

L'attribution d'un code spécifique à l'IHC pour ALK dans le *Répertoire* permettrait un suivi de la volumétrie, à ce jour impossible pour cette analyse. Toutefois, la complexité associée à l'attribution d'un code spécifique à chaque nouvelle analyse d'IHC pourrait constituer un enjeu de gestion pour le MSSS.

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Guide de pratique clinique appuyé par une revue systématique

- Guide de pratique clinique publié conjointement par le CAP, l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) et l'Association for Molecular Pathology (AMP) [Lindeman *et al.*, 2018].

Ce guide recommande la détection d'ALK par IHC en guise d'alternative à l'analyse par FISH. Il ne fait aucune mention d'une confirmation de l'IHC par FISH.

Lignes directrices d'associations professionnelles

- American Society of Clinical Oncology (ASCO) [Kalemkerian *et al.*, 2018]
Le panel d'expert de l'ASCO appuie la recommandation du CAP/IASLC/AMP en lien avec la détection d'ALK par IHC comme une alternative à l'analyse par FISH, sans préciser si les résultats d'IHC doivent être confirmés par FISH.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [2018]
La détection des réarrangements d'ALK est recommandée, mais la méthode à privilégier n'est pas déterminée clairement. Le FISH est la méthode de référence pour détecter les réarrangements du gène *ALK*. L'IHC peut s'avérer une bonne méthode de détection sans nécessiter de confirmation par FISH. Cependant, la confirmation d'un résultat obtenu par IHC est encouragée. Le séquençage de nouvelle génération et la PCR en temps réel constituent d'autres avenues pour l'analyse d'ALK.
- Lung Cancer Canada (LCC) [Melosky *et al.*, 2018]
Un groupe d'experts en oncologie thoracique recommande la détection d'ALK chez les patients présentant un CPNPC de stade avancé dès le diagnostic. Le guide du LCC cite l'étude CALK et préconise la détection d'ALK en IHC, suivi d'une confirmation par FISH pour les résultats faibles ou équivoques.

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Analyse ALK-IHC

La recommandation de l'INESSS

Considérant qu'il s'agit d'une demande de désignation complémentaire pour une analyse déjà au *Répertoire*, les données de validation analytique ont été jugées :

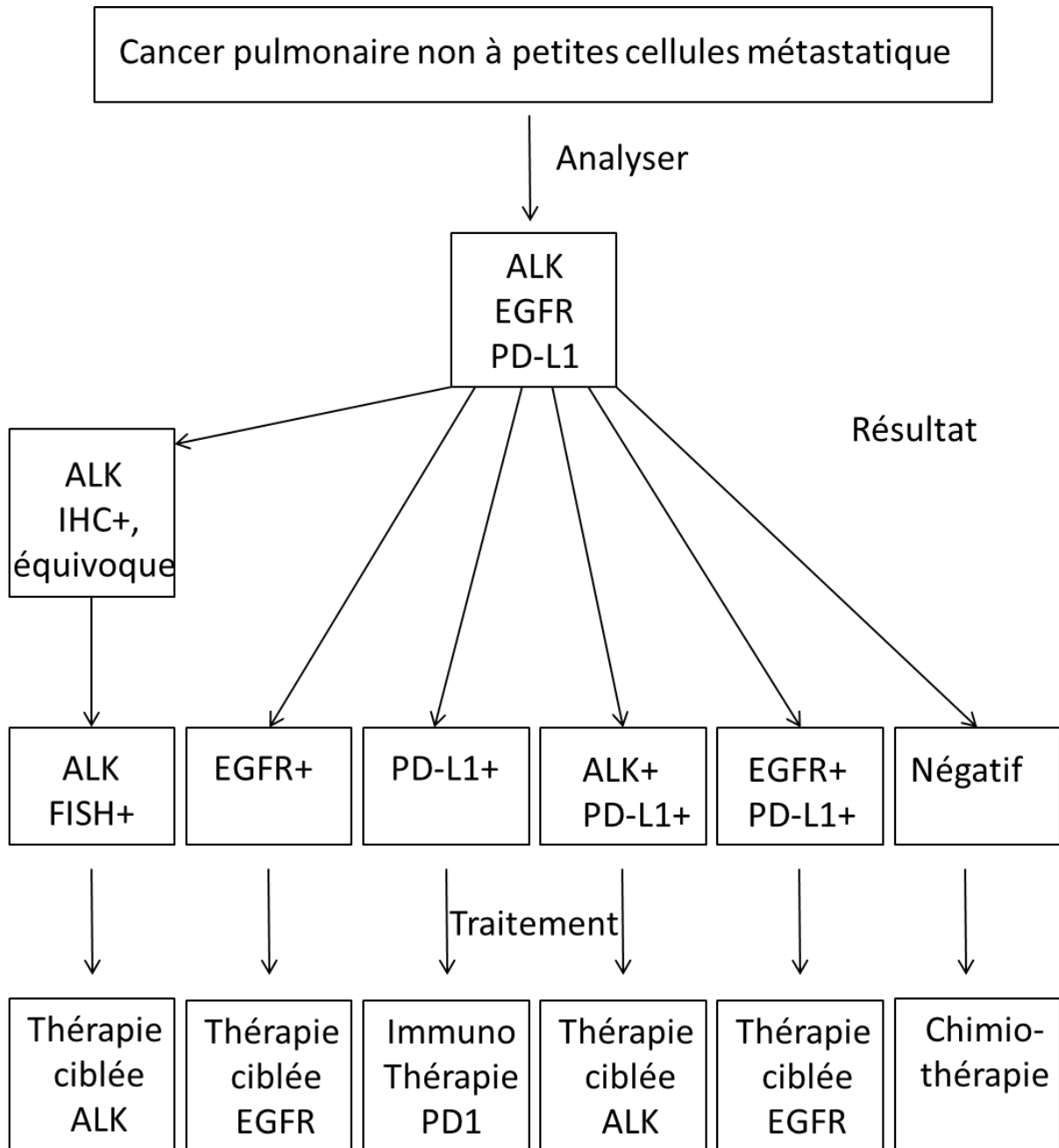
- ☒ Complètes
- ☐ Incomplètes

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité clinique de l'analyse est reconnue.
- ✓ Les données de validation analytique ont été jugées suffisantes.

ANNEXE A

Algorithme clinique de diagnostic et de traitement



Source : Tiré des informations fournies par le demandeur.

RÉFÉRENCES

- Cancer Genome Atlas Research Network (CGARN). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543-50.
- Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E, Brandao G, Carter RF, Bigras G, et al. Canadian anaplastic lymphoma kinase study: A model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014;9(9):1255-63.
- Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387(10027):1540-50.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules. Québec, Qc : INESSS; 2017. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Juin_2017/04-Expression-proteine-PD-L1-immunohistochimie.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments – Médicament d'exception – Avec conditions. Québec, Qc : INESSS; 2015. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Fevrier_2016/Xalkori_2015_10_cav.pdf.
- Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2018;36(9):911-9.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(3):321-46.
- McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, Salameire D, Lefebvre C, Ceccaldi F, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: A French study. *J Thorac Oncol* 2012;7(2):348-54.
- Melosky B, Blais N, Cheema P, Couture C, Juergens R, Kamel-Reid S, et al. Standardizing biomarker testing for Canadian patients with advanced lung cancer. *Curr Oncol* 2018;25(1):73-82.

- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Non-small cell lung cancer. Version 3.2018. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Fort Washington, PA : NCCN; 2018. Disponible à : https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
- Paik JH, Choe G, Kim H, Choe JY, Lee HJ, Lee CT, et al. Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: Correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol* 2011;6(3):466-72.
- Park HS, Lee JK, Kim DW, Kulig K, Kim TM, Lee SH, et al. Immunohistochemical screening for anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2012;77(2):288-92.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823-33.
- Savic S, Bode B, Diebold J, Tosoni I, Barascud A, Baschiera B, et al. Detection of ALK-positive non-small-cell lung cancers on cytological specimens: High accuracy of immunocytochemistry with the 5A4 clone. *J Thorac Oncol* 2013;8(8):1004-11.
- Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, O'Toole S, Yip P, Wright GM, et al. Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: A multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2013;26(12):1545-53.
- Sholl LM, Weremowicz S, Gray SW, Wong KK, Chirieac LR, Lindeman NI, Hornick JL. Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2013;8(3):322-8.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448(7153):561-6.
- Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371(23):2167-77.

Analyse d'ALK par hybridation *in situ* en fluorescence

(RÉFÉRENCE – 2018.03.007V)

Avis d'évaluation

(Désignation complémentaire)

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Institut universitaire de cardiologie et pneumologie de Québec – Université Laval

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Tous les membres du comité présents à la rencontre ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

2. RÉSUMÉ

	Analyse d'ALK par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH)
Demandeur	Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval.
Nom et objectif de l'analyse	Confirmer la présence d'un réarrangement du gène <i>ALK</i> par FISH chez les patients ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) localement avancé ou métastatique dont l'analyse d'ALK par immunohistochimie (IHC) s'est avérée positive.
Situation actuelle	Cette analyse est déjà réalisée au Québec depuis quelques années. Toutefois, elle ne possède pas de code unique dans le <i>Répertoire</i> .
Nombre d'analyses prévues	Le centre demandeur estime devoir effectuer environ 40 confirmations par FISH annuellement.
Valeur thérapeutique	La thérapie associée à l'analyse évaluée prolonge la survie médiane sans progression de 3,9 mois comparativement aux chimiothérapies administrées. Elle permettrait à une proportion significative de patients d'obtenir une réponse tumorale objective comparativement aux chimiothérapies. De plus, la durée médiane de cette réponse semble en faveur du traitement.
Validité analytique	L'analyse par FISH montre une concordance de 100 % avec l'analyse par IHC utilisée comme référence.
Impact budgétaire	L'ajout des analyses au <i>Répertoire</i> pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 6 800 \$ par année pour les besoins actuels de l'IUCPQ.
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	Le guide de pratique clinique publié conjointement par le CAP, l'IASLC et l'AMP ainsi que les lignes directrices de l'ASCO recommandent l'utilisation de l'IHC comme alternative au FISH pour l'analyse d'ALK. Le NCCN recommande l'analyse d'ALK, sans spécifier la méthode à privilégier. Le LCC recommande l'analyse par IHC suivie d'une confirmation par FISH pour les résultats équivoques.
Enjeux particuliers	L'utilisation d'une sonde non homologuée et de réactifs maison, alors qu'une trousse homologuée est disponible constitue un enjeu. Le demandeur affirme que, de plus en plus, ce ne sont plus les cas positifs ou équivoques qui sont confirmés par FISH, mais seulement les cas équivoques.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

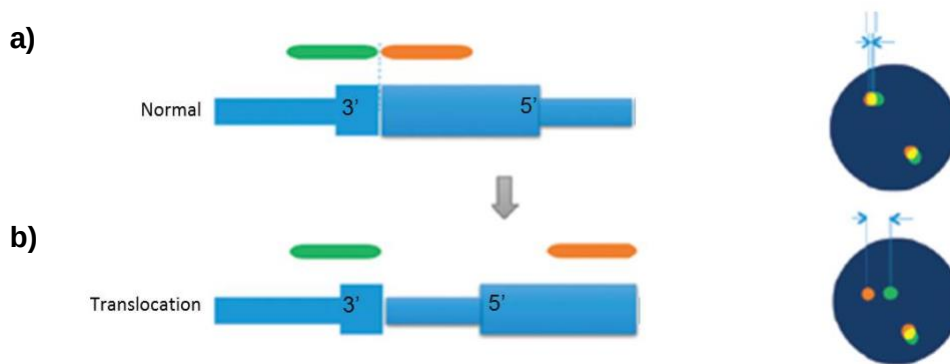
3.1. Nom et objectifs de l'analyse

ALK-FISH

Confirmer la présence d'un réarrangement du gène *Anaplastic Lymphoma Kinase* (*ALK*) en utilisant la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*) chez les patients présentant un cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) métastatique dont la détection par immunohistochimie (IHC) est positive ou équivoque.

3.2. Description de la méthode

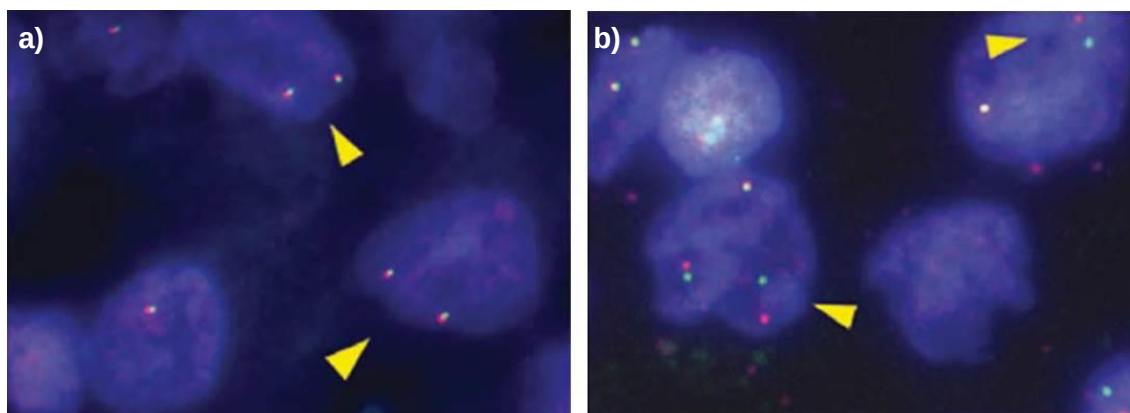
Les résultats positifs ou équivoques en IHC sont confirmés par FISH. Les réarrangements du gène *ALK* se traduisent par une translocation de type point de bris (*break-apart*), comme détecté par l'analyse FISH utilisée par le demandeur (figure 1).



Source : Schéma tiré et adapté du site Web d'Agilent Technologies, <https://www.agilent.com/>

Figure 1 Translocation dans le gène *ALK* visualisée par FISH. a) aucun réarrangement : deux signaux de fusion (patron normal), b) réarrangement positif : un signal de fusion et deux signaux distincts correspondant aux extrémités 3' et 5' (patron typique de translocation).

Le FISH permet d'évaluer qualitativement, à l'aide d'une sonde fluorescente, le pourcentage des cellules tumorales ayant subi une translocation dans le gène *ALK* grâce à la stratégie par point de bris (*break-apart*). Une translocation peut générer deux types de patrons : le patron typique *break-apart* où un signal de fusion et deux signaux distincts correspondant aux extrémités 3' et 5' sont observés (figure 1b et 2b), et un patron atypique où on observe un signal émanant de l'extrémité 3', accompagné d'un signal de fusion ainsi qu'un signal de l'extrémité 3' sans signal de fusion.



Source : Selinger *et al.*, 2013.

Figure 2 Exemple de réarrangement du gène *ALK* par FISH. a) aucun réarrangement : deux signaux de fusion (patron normal), b) réarrangement positif : un signal de fusion et deux signaux distincts correspondant aux extrémités 3' et 5' (patron typique de translocation).

Les échantillons sont considérés comme positifs lorsqu'un réarrangement est observé dans plus de 15 % des cellules tumorales analysées par FISH [Selinger *et al.*, 2013].

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Le prélèvement de la biopsie et la préparation des échantillons (fixation des spécimens au formaldéhyde et inclusion en paraffine) seront effectués par les laboratoires des centres référents. Par la suite, les échantillons seront acheminés au laboratoire d'anatomopathologie et de cytologie de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval, où des lames seront produites pour l'analyse d'ALK en IHC. Le résultat sera interprété par une équipe de cinq anatomopathologistes spécialisés en pathologie pulmonaire. Les cas positifs ou équivoques en IHC seront testés par FISH pour confirmer la présence d'un réarrangement du gène *ALK*.

Les résultats pour ALK seront colligés dans un rapport incluant les biomarqueurs EGFR et PD-L1 faisant partie du même algorithme (annexe A). Le rapport d'analyses sera ensuite acheminé au clinicien requérant. Le délai cible préconisé par les guides de pratique cliniques [Lindeman *et al.*, 2018] pour cette analyse est de 10 jours ouvrables, mais, étant donné l'état clinique de certains patients, le demandeur prévoit un délai de réponse plus court, soit de 4 jours ouvrables.

3.4. Société ou concepteur

Le demandeur utilise une sonde point de bris pour ALK (SureFISH ALK, ROS1 and RET) de la compagnie Agilent Technologies et des réactifs maison sont utilisés pour la détection de la fluorescence.

3.5. Homologation

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont fait l'objet d'aucune homologation par Santé Canada ou la Food and Drug Administration (FDA).

3.6. Valeur pondérée : 156,98

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé ou métastatique.

4.2. Description de la maladie visée

Données sociodémographiques

Le cancer du poumon représente le deuxième type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes et chez les hommes, ainsi que la première cause de décès par cancer au Québec. En 2017, il a été estimé que 8 700 nouveaux cas de cancer du poumon ont été diagnostiqués et que 6 700 personnes sont décédées des suites de cette maladie. Plus spécifiquement, le CPNPC représente environ 85 % des cas de cancer du poumon. La majorité des patients atteints d'un CPNPC à un stade localement avancé ou métastatique ne sont pas admissibles à la chirurgie et le pronostic de survie à 5 ans varie de 1 % à 7 %³.

Altérations géniques

Le gène *ALK* fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Chez certains patients atteints de CPNPC, une translocation dans le gène *ALK* est observée. Ce réarrangement est responsable de l'activité tyrosine kinase constitutive, qui favorise la prolifération cellulaire tumorale [Soda *et al.*, 2007]. On estime qu'environ 2,5 % des CPNPC avec composante d'adénocarcinome présentent des réarrangements du gène *ALK* dans la population canadienne [Cutz *et al.*, 2014].

D'autres altérations géniques (mutations somatiques, mutations affectant l'expression protéique, réarrangements géniques) ont été décelées chez les patients souffrant de CPNPC [CGARN, 2014]. Certaines d'entre elles sont associées à des biomarqueurs et permettent aux patients de bénéficier de thérapies ciblées. Les altérations pour lesquelles il existe une thérapie ciblée sont mentionnées dans le tableau 1.

³ Extrait tiré et adapté de : Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules [INESSS, 2017].

Tableau 1 Biomarqueurs moléculaires du cancer du poumon non à petites cellules et thérapies associées

BIOMARQUEUR	ALTÉRATION	FRÉQUENCE (%)	THÉRAPIE APPROUVÉE	
			SANTÉ CANADA	QUÉBEC
EGFR	Mutations L858R et del19	10-15 %	géfitinib, afatinib	géfitinib afatinib
EGFR	Mutation T790M	60 % patients dont la maladie a progressé sur anti-EGFR	osimertinib	osimertinib
ALK	Réarrangements géniques	3-5 %	crizotinib, alectinib, céritinib, brigatinib	crizotinib, céritinib
PD-L1	Proportion des cellules cancéreuses exprimant la protéine PD-L1	≥ 50 % cellules : 28-30 % 1-49 % des cellules : 38 % < 1 % des cellules : 34 %	pembrolizumab	pembrolizumab
BRAF	Mutation V600	1-2 % des adénocarcinomes	dabrafénib + tramétinib	

Sources : NCCN, 2018; Herbst *et al.*, 2016; Reck *et al.*, 2016 et les données de l'INESSS.

Abréviations : ALK : *Anaplastic Lymphoma Kinase*; BRAF : *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma B*; EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*; PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*.

Thérapies non ciblées⁴

Le traitement de première intention pour les patients atteints de CPNPC de stade avancé ou métastatique sans réarrangements du gène *ALK* consiste en l'association d'une platine (cisplatine ou carboplatine) au pémétrexed (Alimta^{MC}) ou à la gemcitabine (Gemzar^{MC} et versions génériques).

Thérapie ciblée

Le traitement de première intention pour les patients présentant des réarrangements du gène *ALK* est le crizotinib (Xalkori^{MC}), un inhibiteur sélectif du récepteur tyrosine kinase de la protéine *ALK* et de ses variantes oncogènes. Le céritinib est un autre inhibiteur sélectif du récepteur tyrosine kinase de la protéine *ALK* qui est prescrit en deuxième intention chez les patients présentant un échec de traitement au crizotinib. Ces inhibiteurs ont une activité antinéoplasique sur les tumeurs présentant un réarrangement du gène *ALK*.

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Du 1^{er} janvier au 27 novembre 2017 (331 jours), le laboratoire de l'IUCPQ a réalisé 1 486 analyses du gène *ALK* par IHC. Selon ces données, on estime à 1 640 le nombre annuel de ces analyses dans la population desservie par le centre demandeur. Considérant un taux de positivité d'environ 2,5 % pour *ALK* dans la population canadienne atteinte d'un CPNPC, le demandeur prévoit devoir confirmer l'analyse d'environ 40 spécimens par FISH par année.

⁴ Extrait tiré de : Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments [INESSS, 2015].

4.4. Situation actuelle

L'analyse des réarrangements du gène *ALK* par FISH est un test déjà réalisé dans le laboratoire du centre demandeur ainsi que dans d'autres centres québécois depuis quelques années. Toutefois, l'analyse de confirmation par FISH ne possède pas de code unique dans le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* du ministère de la Santé et des Services sociaux (MSSS), ci-après nommé *Répertoire*.

4.5. Données médico administratives

Le laboratoire du centre demandeur confirme qu'il utilise le code 90000 des procédures non répertoriées (PNR) du *Répertoire* pour la confirmation par FISH (valeur pondérée : 0,00).

4.6. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, cette nouvelle analyse répond à un besoin clinique qui n'est pas couvert actuellement. Les avantages de l'analyse proposée sont :

- Détecter les patients atteints d'un CPNPC métastatique ALK-positif leur permettant d'avoir accès à une thérapie ciblée;
- Offrir des analyses dont le protocole est déjà optimisé et validé;
- Offrir un court délai de réponse : possibilité de remettre les résultats du FISH en 4 jours ouvrables.

4.7. Assurance qualité

Le laboratoire du centre demandeur participe aux contrôles de qualité externe du College of American Pathologists (CAP) et du Contrôle Canadien de la Qualité en Immunohistochimie (cIQc).

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif d'établir ou de préciser un diagnostic.

5.2. Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

5.3. Valeur thérapeutique

La valeur thérapeutique du crizotinib a été reconnue par l'INESSS chez les patients ALK-positifs, suite à l'analyse de l'étude PROFILE 1014 [Solomon *et al.*, 2014]. Cette étude comparait le crizotinib à une chimiothérapie à base de sels de platine chez 343 adultes atteints d'un CPNPC localement avancé, récurrent ou métastatique, présentant des réarrangements du gène *ALK*.

Les résultats de l'étude démontrent que le crizotinib prolonge la survie médiane sans progression de 3,9 mois comparativement aux chimiothérapies administrées. Le crizotinib permettrait à une proportion significative de patients d'obtenir une réponse tumorale objective comparativement aux chimiothérapies. De plus, la durée médiane de cette réponse semble en faveur du traitement par la thérapie ciblée (tableau 3).

Tableau 3 Principaux résultats d'efficacité de l'étude PROFILE 1014

PARAMÈTRES D'EFFICACITÉ	CRIZOTINIB (n = 172)	CHIMIOTHÉRAPIE (n = 171)	RRI (IC 95 %) VALEUR p
Survie médiane sans progression	10,9 mois	7 mois	0,45 (0,35 à 0,60) p < 0,001
Réponse tumorale objective (% patients)	74 %	45 %	p < 0,001
Durée médiane de la réponse tumorale	11,3 mois	5,3 mois	Non disponible

Source : Tableau tiré et adapté de Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments [INESSS, 2015].

Abréviations : IC : Intervalle de confiance; RRI : Rapport des risques instantanés (*hazard ratio*).

Enfin, l'évaluation de la qualité de vie par des instruments de mesure validés montre que le crizotinib améliore de façon significative la qualité de vie des patients comparativement à la chimiothérapie. Le crizotinib réduit les symptômes associés à la maladie, dont la douleur, la toux et la dyspnée.

5.4. Validité analytique

Une étude rapportant la performance analytique du FISH réalisée avec la sonde SureFISH ALK, ROS1 and RET (compagnie Agilent Technologies) a été repérée. Takeda et ses collaborateurs [2017] ont analysé par FISH 21 échantillons provenant de patients présentant un CPNPC ALK-positif avec la sonde SureFISH et avec la trousse Vysis^{MC} ALK Break (Abbott Laboratories). Les auteurs ont montré une concordance de 100 % entre les résultats.

5.5. Données fournies par le demandeur

Étude CALK

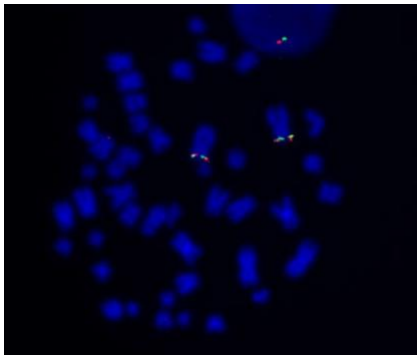
Le centre demandeur a participé à l'étude pancanadienne multicentrique CALK (*Canadian Anaplastic Lymphoma Kinase*) [Cutz *et al.*, 2014]. Cette étude avait comme objectif de développer une méthode standardisée et optimisée afin de favoriser l'implantation de la détection et de la confirmation des réarrangements du gène *ALK* dans les laboratoires canadiens.

Parmi les 13 laboratoires ayant participé au processus de standardisation et d'optimisation des protocoles d'IHC et de FISH, trois ont aussi été impliqués dans une phase prospective. Cette phase consistait à valider les protocoles d'IHC et de FISH préalablement mis au point avec 411 échantillons. La trousse Vysis^{MC} ALK Break (Abbott Laboratories) a été utilisée pour les expériences de FISH.

Données de validation du demandeur

Le demandeur a fourni des éléments de validation de la technique de FISH utilisée pour la détection des réarrangements du gène *ALK* dans le CPNPC.

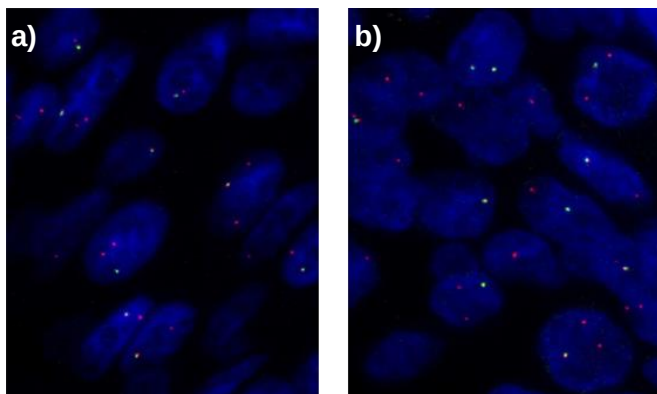
Le demandeur a vérifié que la sonde SureFISH ALK (Agilent Technologies) s'hybride sur le chromosome 2 sur préparation en métaphase (figure 3).



Source : Tiré des données fournies par le demandeur.

Figure 3 Localisation de la sonde SureFISH ALK.

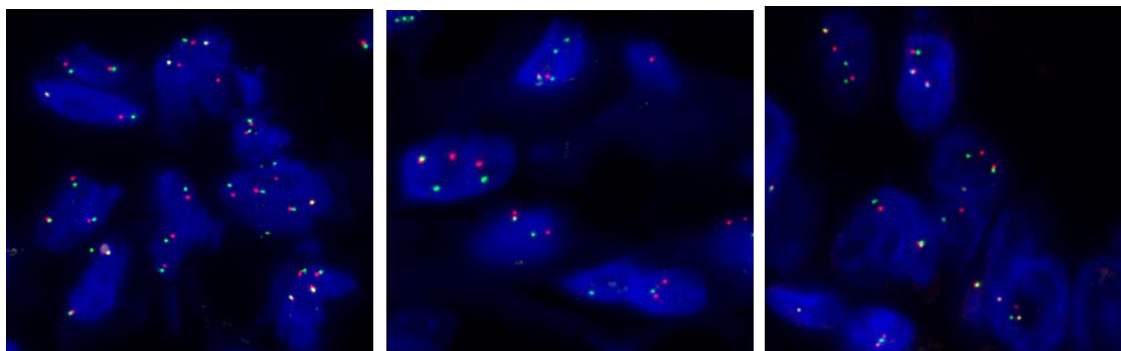
La sonde SureFISH ALK, ROS1 and RET (Agilent Technologies) a été comparée à la trousse Vysis^{MC} ALK Break (Abbott Laboratories). Les résultats montrent que les signaux des deux sondes ont une intensité au moins égale (figure 4).



Source : Tiré des données fournies par le demandeur.

Figure 4 Comparaison des sondes. a) Sonde Vysis^{MC} ALK Break, b) Sonde SureFISH ALK.

Des résultats de FISH avec la sonde SureFISH ALK obtenus avec 3 échantillons connus positifs pour un réarrangement du gène *ALK* montrant un signal point de bris (*break-apart*) sont présentés à la figure 5.



Source : Tiré des données fournies par le demandeur.

Figure 5 Exemples de réarrangements montrant un signal point de bris (*break-apart*) pour 3 échantillons ALK-positifs.

Des résultats obtenus avec des échantillons présentant une expression élevée ou équivoque de la protéine ALK en IHC ont été confirmés par FISH et sont présentés dans le tableau 4. Une concordance de 100 % est observée.

Tableau 4 Résultats du FISH avec la sonde SureFISH comparés à l'IHC pour ALK

ÉCHANTILLONS SÉLECTIONNÉS		LECTURE DU FISH		EXPLICATION
DESCRIPTION	NOMBRE	RÉSULTAT	NOMBRE	
IHC positive	16	Positif	12	s. o.
		Indéterminé	3	Absence de cellules tumorales
		Indéterminé	1	Aucun marquage de la zone tumorale
IHC équivoque	9	Négatif	8	s. o.
		Indéterminé	1	Absence de matériel résiduel
Sélection aléatoire	14	Négatif	13	s. o.
		Indéterminé	1	Absence de cellules tumorales résiduelles

Source : Tiré des données fournies par le demandeur.

Abréviations : IHC : Immunohistochimie; FISH : Hybridation in situ en fluorescence (FISH, de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*); s. o. : Sans objet.

Les résultats d'une participation à un contrôle de qualité externe sont présentés à la figure 6. Le laboratoire du demandeur correspond au Lab ID 146 (le Core 2 était incomplet).

Lab ID/ Core	107	111	115	123	125	137	146	186	191	202	211	R1
1	P	P	U	P	N	P	P	U	P	P	U	P
2	P	P	P	U	P	P	U	P	U	P	U	P
3	P	P	U	P	U	P	P	U	P	P	P	P
4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	U	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	U	N

Source : Tiré des données fournies par le demandeur.

Figure 6 Résultats d'une participation à un contrôle de qualité externe.

Des résultats de reproductibilité et de répétabilité par FISH ont été obtenus sur un échantillon positif testé en triplicata lors d'une même procédure ainsi que lors de trois procédures réalisées en trois jours distincts par deux techniciens différents (figure 7). Les résultats ont été analysés par deux lecteurs.

FISH ALK H08- 2061-F15	Inter-essai			Intra-essai
	Technicien 1		Technicien 2	
	lame #1 – Jour 1	lame #2 – Jour 2	lame #3– Jour 3	
Lecteur 1	Positif (66%)	Positif (70%)	Positif (66%)	
Lecteur 2	Positif (72%)	Positif (74%)	Positif (64%)	
			lame #4– Jour 3	
Lecteur 1			Positif (70%)	
Lecteur 2			Positif (74%)	
			lame #5– Jour 3	
Lecteur 1			Positif (68%)	
Lecteur 2			Positif (68%)	

Figure 7 Données de reproductibilité et de répétabilité.

Les expériences inter-essai (reproductibilité) montrent une positivité des cellules tumorales variant de 66 à 74 %. Les expériences intra-essai (répétabilité) montrent que la positivité des cellules tumorales varie de 64 à 74 %.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse permettant de confirmer par FISH un réarrangement du gène *ALK* chez les patients atteints de CPNPC métastatique. Cette analyse a pour objectif de détecter les tumeurs présentant un réarrangement du gène *ALK* en vue de l'utilisation d'une thérapie ciblée avec un inhibiteur de tyrosine kinase, le crizotinib. Les coûts liés à cette analyse sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective du MSSS. L'analyse d'impact budgétaire repose sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans le tableau 5. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- Du 1^{er} janvier au 27 novembre 2017 (331 jours), le laboratoire du CHU de Québec, site IUCPQ, a réalisé 1 486 analyses d'ALK par IHC. En se basant sur ces données, le demandeur anticipe que l'analyse serait réalisée sur 1 640, 1 738 et 1 842 échantillons au cours de chacune des trois prochaines années, respectivement.
- En considérant une fréquence de positivité de 2,5 % pour un réarrangement du gène *ALK*, le demandeur estime que 40, 43 et 46 analyses par FISH seraient réalisées au cours de chacune des trois prochaines années, respectivement.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur pour les analyses par FISH est de 156,98. Le coût de ces analyses est actuellement pris en charge par le laboratoire.

- Un code PNR (procédure non répertoriée) est utilisé pour l'analyse d'ALK par FISH, dont la VP est de 0.
- Les coûts relatifs aux traitements ne sont pas pris en compte dans cet avis puisque les patients avec CPNPC métastatique bénéficient déjà du dépistage d'ALK et ont donc déjà accès à la thérapie ciblée. Seuls les coûts liés aux analyses d'ALK par FISH seront considérés.

Tableau 5 Coûts liés à l'introduction au Répertoire des analyses permettant de détecter les réarrangements du gène *ALK* par FISH dans les CPNPC métastatiques au CHU de Québec, site IUCPQ

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : Sans l'ajout de l'analyse ALK FISH				
Analyses ALK-FISH	41	43	46	130
Coûts*	0 \$	0 \$	0 \$	0 \$
Nouveau scénario : Avec l'ajout de l'analyse ALK-FISH				
Analyses ALK-FISH	41	43	46	130
Coûts	6 436 \$	6 750 \$	7 221 \$	20 407 \$
Impact net	6 436 \$	6 750 \$	7 221 \$	20 407 \$
Analyses de sensibilité†	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			18 367 \$
	Pour 3 ans, coût les plus élevés			22 605 \$

* Coût présentés ici selon la perspective du MSSS. Ces coûts, évalués à 6 400 \$ pour la première année, sont actuellement assumés par le laboratoire demandeur.

† Les coûts présentés en analyses de sensibilité considèrent une variation du nombre d'analyses de 10 %.

Ainsi, l'ajout de l'analyse permettant de confirmer les réarrangements du gène *ALK* par FISH dans les CPNPC métastatiques pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 6 800 \$ par année pour les besoins actuels de l'IUCPQ.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Enjeux techniques

L'utilisation d'une sonde non homologuée et de réactifs maison, alors qu'une trousse homologuée est disponible constitue un enjeu.

Le demandeur souligne que, de plus en plus, ce ne sont plus les cas positifs et équivoques qui sont confirmés en FISH, mais seulement les cas équivoques. Cela contribue à réduire le nombre d'analyses par FISH.

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Guide de pratique clinique appuyé par une revue systématique

- Guide de pratique clinique publié conjointement par le CAP, l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) et l'Association for Molecular Pathology (AMP) [Lindeman *et al.*, 2018].

Ce guide recommande la détection d'ALK par IHC en guise d'alternative à l'analyse par FISH. Il ne fait aucune mention d'une confirmation de l'IHC par FISH.

Lignes directrices d'associations professionnelles

- American Society of Clinical Oncology (ASCO) [Kalemkerian *et al.*, 2018]
Le panel d'expert de l'ASCO appuie la recommandation du CAP/IASLC/AMP en lien avec la détection d'ALK par IHC comme une alternative à l'analyse par FISH, sans préciser si les résultats d'IHC doivent être confirmés par FISH.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [2018]
La détection des réarrangements d'ALK est recommandée, mais la méthode à privilégier n'est pas déterminée clairement. Le FISH est la méthode de référence pour détecter les réarrangements du gène *ALK*. L'IHC peut s'avérer une bonne méthode de détection sans nécessiter de confirmation par FISH. Cependant, la confirmation d'un résultat obtenu par IHC est encouragée. Le séquençage de nouvelle génération et la PCR en temps réel constituent d'autres avenues pour l'analyse d'ALK.
- Lung Cancer Canada (LCC) [Melosky *et al.*, 2018]
Un groupe d'experts en oncologie thoracique recommande la détection d'ALK chez les patients présentant un CPNPC de stade avancé dès le diagnostic. Le guide du LCC cite l'étude CALK et préconise la détection d'ALK en IHC, suivie d'une confirmation par FISH pour les résultats faibles ou équivoques.

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Analyse ALK-FISH

La recommandation de l'INESSS

Considérant qu'il s'agit d'une demande de désignation complémentaire pour une analyse déjà au *Répertoire*, les données de validation analytique ont été jugées:

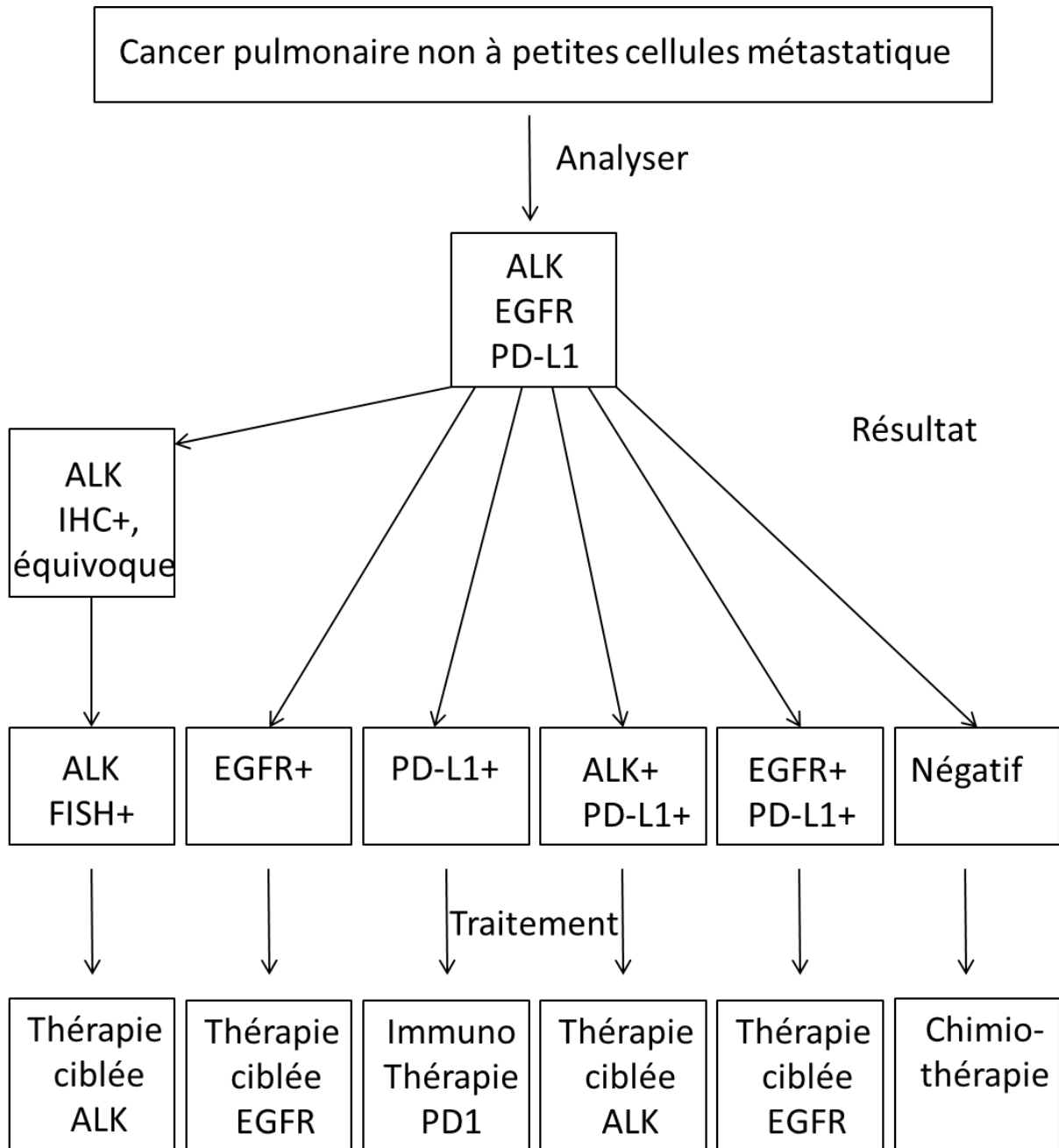
- ☐ Complètes
- ☒ Incomplètes

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité clinique de l'analyse est reconnue.
- ✓ Le laboratoire demandeur doit produire un plan de validation détaillé en s'appuyant sur la norme CSA Z 316.8-F18 et le faire approuver par l'INESSS.
- ✓ L'INESSS recommande que la désignation soit conditionnelle à la production des données de validation analytique pré spécifiées par le plan de validation.

ANNEXE A

Algorithme clinique de diagnostic et de traitement



Source : Tiré des informations fournies par le demandeur.

RÉFÉRENCES

- Cancer Genome Atlas Research Network (CGARN). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543-50.
- Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E, Brandao G, Carter RF, Bigras G, et al. Canadian anaplastic lymphoma kinase study: A model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014;9(9):1255-63.
- Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387(10027):1540-50.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules. Québec, Qc : INESSS; 2017. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Juin_2017/04-Expression-proteine-PD-L1-immunohistochimie.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments – Médicament d'exception – Avec conditions. Québec, Qc : INESSS; 2015. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Fevrier_2016/Xalkori_2015_10_cav.pdf.
- Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2018;36(9):911-9.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(3):321-46.
- Melosky B, Blais N, Cheema P, Couture C, Juergens R, Kamel-Reid S, et al. Standardizing biomarker testing for Canadian patients with advanced lung cancer. *Curr Oncol* 2018;25(1):73-82.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Non-small cell lung cancer. Version 3.2018. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Fort Washington, PA : NCCN; 2018. Disponible à : https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.

- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823-33.
- Selinger CI, Rogers TM, Russell PA, O'Toole S, Yip P, Wright GM, et al. Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: A multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2013;26(12):1545-53.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448(7153):561-6.
- Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371(23):2167-77.
- Takeda M, Kasai T, Shimizu S, Kitaichi M, Kojima K, Nagoya A, et al. Assessment of ALK gene rearrangement in lung cancer using a new rapid automated SureFISH (Dako Omnis) assay. *J Clin Pathol* 2017;70(8):712-4.

DÉTECTION DE MUTATIONS DU GÈNE *KRAS* PAR TAAN (RÉFÉRENCE – 2018.03.004V)

Avis d'évaluation

(Désignation complémentaire)

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CHU de Québec – Université Laval

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Tous les membres du comité présents à la rencontre ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

2. RÉSUMÉ

	Analyse détection de mutations du gène <i>KRAS</i> par TAAN
Demandeur	CHU de Québec – Université Laval.
Nom et objectif de l'analyse	– Détection de mutations du gène <i>KRAS</i> par TAAN pour déterminer l'admissibilité des patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRm) à un traitement anti-EGFR. Analyse maison reposant sur la méthode COLD-PCR.
Situation actuelle	– La recherche des mutations somatiques dans le gène <i>KRAS</i> est le test initial pour tous les patients susceptibles de recevoir un traitement avec anti-EGFR. – La détection des mutations du gène <i>KRAS</i> figure actuellement dans le <i>Répertoire</i> (code 65070). – Elle est réalisée avec une trousse commerciale ou repose sur d'autres types de TAAN. Les mutations du gène <i>KRAS</i> sont également détectées dans l'analyse révélant les mutations des gènes <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> et <i>BRAF</i> par SNG (code 65003).
Nombre d'analyses prévues	150 tests par an pour l'est du Québec.
Valeur diagnostique	L'analyse n'a pas pour objectif d'établir ou de confirmer un diagnostic.
Valeur thérapeutique et pronostique	Le recours à un traitement anti-EGFR est associé à un bénéfice clinique chez les patients atteints d'un CCRm et dont la tumeur est exempte de mutations somatiques dans <i>KRAS</i> .
Validité analytique	– Comparativement à la PCR conventionnelle, la COLD-PCR augmente la sensibilité du séquençage de Sanger. – Elle est adéquate pour la détection des mutations dans les échantillons contenant moins de 30 % de cellules tumorales. La COLD-PCR combinée à l'analyse de courbe de fusion est assez sensible pour détecter les mutations du gène <i>KRAS</i> dans une tumeur contenant environ 3 % de cellules cancéreuses.
Impact budgétaire	– Aucune analyse d'impact budgétaire n'a été effectuée. La VP indiquée pour l'analyse (108,44) est inférieure à celle qui est actuellement dans le <i>Répertoire</i> (120,00).
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	– Le NCCN (National Comprehensive Cancer Network), l'ASCO (American Society of Clinical Oncology), l'ASCP (American Society for Clinical Pathology), le CAP (College of American Pathologists), l'AMP (Association of Molecular Pathology) recommandent d'effectuer la détection de mutations dans <i>KRAS</i> chez les patients atteints d'un CCRm et susceptibles de recevoir des anti-EGFR. – Le AHS (Alberta Health Services) recommande la recherche de mutations activatrices des gènes <i>RAS</i> dans les tissus tumoraux des patients qui reçoivent un diagnostic de CCRm. – La société japonaise d'oncologie médicale recommande fortement l'analyse des mutations dans <i>KRAS</i> avant l'instauration d'un traitement anti-EGFR chez les patients avec un CCRm.
Enjeux particuliers	Respect du temps de réponse recommandé à 10 jours ouvrables.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

La détection des mutations du gène *KRAS* par analyse de la courbe de dénaturation suivant l'amplification des acides nucléiques (TAAN) est effectuée chez les patients présentant un cancer colorectal métastatique (CCRm), afin de déterminer leur admissibilité au traitement anti-EGFR (cétuximab, panitumumab).

3.2. Description de la méthode

L'analyse évaluée dans cet avis permet la détection des mutations par le biais des sondes d'hybridation FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) en se servant de la COLD-PCR (coamplification at lower denaturation temperature PCR). Cette technologie s'appuie sur la PCR en temps réel « Real-time PCR », qui permet de détecter des mutations dont la nature et l'emplacement peuvent varier. Elle repose sur l'amplification de chaque exon cible de l'ADN, pour ensuite réaliser une courbe de dénaturation en présence d'une paire de sondes d'hybridation. L'appariement est effectué entre les sondes et la séquence d'ADN sauvage tandis qu'il existe un mésappariement entre celles-ci et la séquence mutée. De ce fait, les températures choisies pour la fusion des sondes à la séquence sauvage ou à la séquence mutée sont différentes et génèrent deux pics distincts de températures de fusion (figure 1). La modification COLD-PCR apportée au protocole permet de favoriser l'amplification des allèles mutés, ce qui augmente la sensibilité de la détection grâce aux réductions de températures de dénaturation (source : document de validation fourni par le laboratoire demandeur).

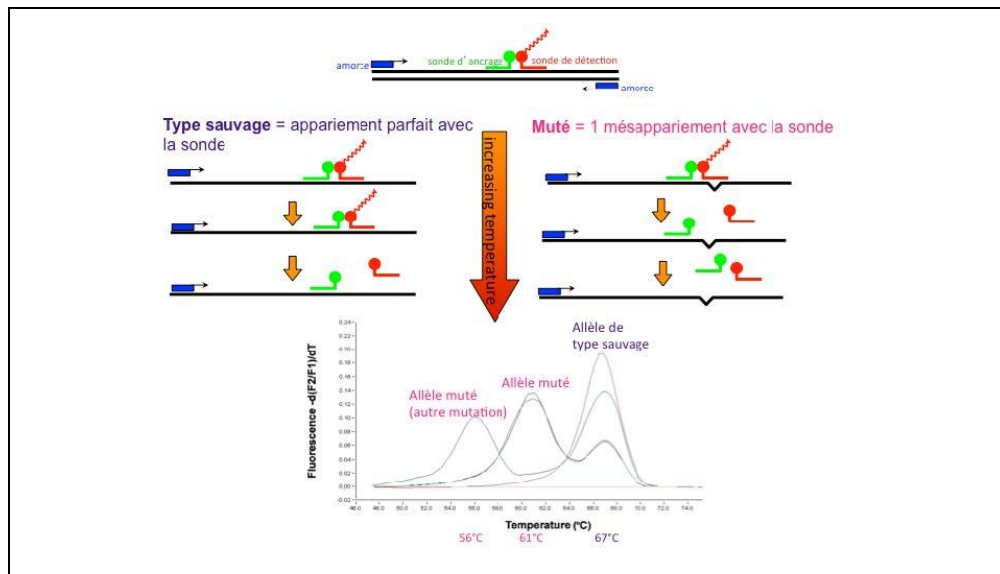


Figure 1 Détection de mutations par les sondes d'hybridation FRET

Source : Données de validation fournies par le laboratoire demandeur.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Une fois que l'identification des patients ciblés par le médecin traitant est effectuée, la demande d'analyse est transférée au laboratoire de pathologie avec les spécimens néoplasiques. Une extraction de l'ADN et l'analyse mutationnelle de

KRAS sont effectuées à la suite de la réception du spécimen au laboratoire. Dans le cas où *KRAS* serait non muté, on procéderait à l'analyse du *NRAS* complémentaire à l'analyse préalable des mutations de *KRAS*.

Algorithme

Une recherche de mutations dans le gène *KRAS* doit être effectuée de façon systématique chez tous les patients candidats à une thérapie avec un anti-EGFR. Il s'agit du test initial puisque 40 % des mutations se retrouvent dans les exons 2, 3, 4 du gène *KRAS*. Une recherche subséquente est ensuite effectuée chez les patients non mutés pour *KRAS*, pour détecter les mutations du gène *NRAS* représentant 5 % à 10 % de mutants supplémentaires.

Temps de réponse

Moins de 10 jours ouvrables.

3.4. Société ou concepteur

Il s'agit d'une analyse maison.

3.5. Homologation

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont fait l'objet d'aucune homologation par Santé Canada ou la Food and Drug Administration (FDA).

3.6. Valeur pondérée : 108,44

Les valeurs pondérées des analyses 65070 et 65003 permettant de rechercher les mutations de *KRAS* dans le cancer colorectal et inscrites dans le *Répertoire* sont respectivement de 120,00 et 390,00.

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (CCRm), pour lesquels un traitement anti-EGFR est envisagé.

4.2. Description de la maladie visée

Incidence du cancer colorectal

Selon les statistiques canadiennes sur le cancer, le cancer colorectal est le deuxième en importance, représentant 13 % de tous les cancers. En 2017 au Canada, 14,5 % des nouveaux cas de cancers chez les hommes et 11,5 % chez les femmes étaient colorectaux [SCC, 2017]. Une projection de 2017 au Québec révèle que 3 800 hommes et 3 000 femmes auraient reçu un diagnostic de cancer colorectal et que respectivement 1 350 et 1 200 en mourraient. Le cancer colorectal représente 12 % de tous les décès attribuables au cancer [SCC, 2017].

Mutations du gène *KRAS*

Les mutations du gène *KRAS* sont rencontrées dans approximativement 30 % à 50 % des tumeurs colorectales [BCBS, 2017; Dienstmann et Tabernero, 2016]. La présence de mutations de *KRAS* et *NRAS* situées dans les exons 2 (codons 12 et 13), 3 (codons 59 et 61) et 4 (codons 117 et 146) prédit un échec au traitement avec un anti-EGFR [BCBS, 2017; INESSS et GÉOQ, 2016]. Il est à noter que les mutations des gènes *RAS* sont mutuellement exclusives, à l'exception de cas rares où elles coexistent [Hsu *et al.*, 2016; De Roock *et al.*, 2010; Hawkes et Cunningham, 2010].

Prise en charge et traitement

Le cancer colorectal est associé à la surexpression cellulaire du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor), ce qui en fait la cible de traitements spécifiques. De ce fait, les traitements ERBITUX^{MC} (cétuximab) et VECTIBIX^{MC} (panitumumab) des anticorps monoclonaux anti-EGFR ont démontré un bénéfice de survie chez les patients atteints de CCRm [INESSS et GÉOQ, 2016; Bristol-Myers, 2013]. Au Québec, le cétuximab et le panitumumab sont administrés en monothérapie pour le traitement de troisième intention du cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR chez les personnes avec un gène *RAS* non muté, un statut de performance selon l'ECOG de 0 à 2; et réfractaires aux chimiothérapies à base d'irinotécan et d'oxaliplatine et qui ont reçu un traitement par fluoropyrimidine [INESSS, 2018a]. De plus, le statut mutationnel des gènes *KRAS* et *NRAS* est reconnu comme outil de sélection des patients atteints de CCRm grâce à leur potentiel prédictif de la réponse à un traitement anti-EGFR [Benson *et al.*, 2017; BCBS, 2017; INESSS et GÉOQ, 2016].

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur prévoit entre 100 et 150 tests par an pour la région de Québec et l'est du Québec.

4.4. Situation actuelle

Il s'agit d'une désignation complémentaire pour la détection des mutations du gène *KRAS* qui figure déjà dans le *Répertoire* sous le code 65070. Les mutations de *KRAS* sont également détectées dans une analyse de séquençage de nouvelle génération combinée à *NRAS* et *BRAF* et figurant également au *Répertoire* sous le code 65003. Le laboratoire requérant effectue l'analyse des mutations du gène *KRAS* depuis 2013. En cas d'absence de mutations dans *KRAS*, les échantillons sont acheminés à l'Hôpital général juif de Montréal pour la détection des mutations du gène *NRAS*. L'analyse du statut mutationnel des exons 2, 3, 4 du gène *KRAS* fait partie des standards de pratique auprès des patients atteints de cancer colorectal métastatique et considérés pour un traitement anti-EGFR [Benson *et al.*, 2018; Sepulveda *et al.*, 2017; INESSS et GÉOQ, 2016].

4.5. Données médico administratives

L'analyse Cancer du côlon; *KRAS*, recherche de mutations ciblées (exons 2, 3, 4) (TAAN) figure dans le *Répertoire* sous le code 65070. Les données médico administratives de cette analyse sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 Données médico administratives de l'analyse du gène *KRAS* (65070)

ANNEE ADMINISTRATIVE	VALEUR PONDÉRÉE [§]	NOMBRE D'ANALYSES	TOTAL DES COUTS (\$)
2015-2016*	94	1 598	150 212
2016-2017†	94	1 194	112 236
2017-2018‡	94	1 394	131 036

Source : Données du ministère de la Santé et des Services sociaux.

* : Les établissements ayant effectué l'analyse étaient le CHU de Québec – Université Laval, le CHUM, l'Hôpital général juif (Sir Mortimer B. Davis) et le CUSM

† : Les établissements ayant effectué l'analyse étaient le CHU de Québec – Université Laval, CIUSSS de l'Estrie-CHUS, CHUM, le CIUSSS du Centre-Ouest-de-l'Île-de-Montréal

‡ : Les établissements ayant effectué l'analyse étaient le CHU de Québec – Université Laval, CIUSSS de l'Estrie-CHUS; CHUM; CIUSSS du Centre-Ouest-de-l'Île-de-Montréal

§ La valeur pondérée a été modifiée à 120,00 dans le Répertoire de 2018-2019.

Par ailleurs, la détection des mutations du gène *KRAS* fait également partie d'une analyse combinée des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* récemment évaluée par l'INESSS avec comme numéro de référence 65003, et pour laquelle aucune donnée médico administrative n'a encore été rapportée.

4.6. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, l'analyse permettrait :

- d'enrichir toutes mutations, même rares, de plusieurs codons voisins en une réaction PCR;
- de détecter toutes les mutations somatiques du gène *KRAS* présentes dans plusieurs codons voisins en une seule réaction de PCR;
- d'optimiser le diagnostic et le traitement en sélectionnant les patients susceptibles de répondre à un traitement anti-EGFR, en limitant les toxicités et les coûts. Il s'avère essentiel d'amorcer aussi rapidement que possible la thérapie chez les patients métastatiques.

4.7. Assurance qualité

Les soixante premiers patients ont été analysés en parallèle par la méthode de séquençage Sanger, avec une concordance de 100 % entre les deux méthodes. Dans la routine, le laboratoire demandeur utilise des contrôles positifs et négatifs lors de chaque analyse. Le demandeur effectue régulièrement le séquençage des patients et participe deux fois par année au programme *KRAS* du contrôle de qualité externe du CAP (College of American Pathologists). Ce programme consiste à tester, deux fois par année, trois échantillons envoyés par le CAP et constitués de tissus fixés au formaldéhyde et enrobés de paraffine (FFEP).

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif d'établir ou de préciser un diagnostic.

5.2. Valeur pronostique et thérapeutique

L'association entre l'absence de mutations somatiques dans le gène *KRAS* des personnes atteintes de CCRm et l'avantage clinique d'un traitement anti-EGFR a été étayée par la documentation repérée dans les avis d'évaluation publiés par l'INESSS [INESSS, 2018a; INESSS, 2018b; INESSS et GÉOQ, 2016].

5.3. Validité analytique

Le demandeur propose d'utiliser la « Co-amplification-at-lower denaturation-temperature PCR » ou COLD-PCR, combinée au séquençage, pour la détection des mutations somatiques du gène *KRAS* [Li *et al.*, 2008]. Dans le cadre de cette évaluation, quatre études, dont deux permettant d'étayer la validité analytique de la technique proposée combinée au séquençage de Sanger [Mariani *et al.*, 2017; Carotenuto *et al.*, 2012] et deux autres portant sur la COLD-PCR suivie d'une analyse de courbes de fusion : « high resolution melting » [Mancini *et al.*, 2010; Pritchard *et al.*, 2010], ont été retenues.

La COLD-PCR combinée au séquençage de Sanger

Afin d'évaluer la nature et l'incidence réelle de mutations « subclonales » dans les échantillons FFEP, Mariani et ses collaborateurs [2017] ont effectué une étude rétrospective en utilisant 240 tumeurs de patients atteints de CCRm. Les échantillons étaient jugés adéquats lorsque l'amplification ou l'enrichissement de la tumeur était supérieur à 50 %, avec au moins 100 cellules néoplasiques.

Une comparaison de sensibilité a été effectuée en analysant entre autres les mutations dans le gène *KRAS* à l'aide d'une trousse commerciale pour effectuer une spectrométrie de masse (Sequenom Inc.) ou en précédant le séquençage de Sanger de la PCR-ciblée ou la « Fast COLD-PCR »⁵.

L'analyse des 240 échantillons par Sequenom a révélé 40 % d'entre eux portant des mutations de l'exon 2 du gène *KRAS* (96/240) et un total de 43/240 échantillons présentant des mutations dans les exons 3-4 de *KRAS* (17/240; 7,1 %), les exons 2-3-4 de *NRAS* (14/240; 5,8 %). Dans le but d'évaluer la sensibilité octroyée au séquençage Sanger en le précédant d'une COLD-PCR, 96/101 échantillons classés non mutés après l'analyse de Sequenom ont été réanalysés, tout comme 70 échantillons qui portaient des mutations dans les gènes *KRAS*, *NRAS*, et *BRAF*.

L'utilisation de la COLD-PCR avant le séquençage Sanger a permis de détecter 15/166 patients portant des mutations additionnelles, parmi lesquelles 9/96 (9,4 %) étaient rapportées dans les cas classés non mutés après l'analyse par Sequenom. De ces 9 cas, 3 portaient des mutations de fréquence supérieure à 1 % et chez 6/9 patients portant ces mutations, elles étaient inférieures à 1 %. L'intervalle de

⁵ La Fast COLD-PCR est la version rapide de la COLD-PCR permettant d'enrichir les mutations G>C et A>T qui réduisent la température de fusion du produit à amplifier, en utilisant une température T_c (température de dénaturation critique) qui promeut l'amplification de l'allèle mutant [Pritchard *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008].

fréquence mutationnelle allélique s'étendait de 0,1 % à 5 %. Par ailleurs 6/15 échantillons mutés nouvellement détectés portaient déjà une mutation dans l'un des trois gènes.

En augmentant la sensibilité de l'analyse, l'ajout d'une étape de COLD-PCR avant d'effectuer le séquençage Sanger a permis de repérer 9,4 % de patients qui auraient, autrement, reçu un traitement anti-EGFR.

La COLD-PCR abrégée permet de détecter les mutations G>T ou G>A de *KRAS* dans les codons 12 et 13. Les auteurs soulignent l'hétérogénéité du CCRm présentant plusieurs mutations coexistantes, ainsi qu'un sous-groupe de patients chez qui les mutations du gène *KRAS* n'ont pu être détectées en raison des limites de la couverture de séquences et de la sensibilité analytique de la méthode employée [Mariani *et al.*, 2017].

D'autre part, Carotenuto et ses collaborateurs [2012] comparent la performance de détection des mutations du gène *KRAS* par séquençage Sanger lorsqu'il est précédé de COLD-PCR ou de PCR-conventionnelle (PCR), à la trousse commerciale Therascreen basée sur la technologie Real-Time PCR. Les échantillons tumoraux prélevés de 52 patients atteints de CCRm étaient sujets à une macrodissection si la quantité de cellules tumorales était inférieure à 70 %. La détection des mutations à partir de lignées cellulaires a révélé que la limite de détection de la fréquence mutationnelle était de 10 % lorsque la PCR était utilisée, au lieu de 2,5 % en employant la Fast COLD-PCR. Cette méthode attribuait une meilleure sensibilité que la PCR dans la détection des mutations G>A et G>T. Cette sensibilité n'était guère améliorée pour la détection des transversions G>C. Les résultats recueillis à partir des échantillons cliniques sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 Performance des technologies PCR et COLD-PCR suivies de séquençage ou Therascreen dans l'analyse des tumeurs du CCRm

MÉTHODES DE DÉTECTION DES MUTATIONS DANS <i>KRAS</i>	NON MUTÉS (n = 8)	MUTÉS (n = 20)	NON DÉTERMINÉS (n = 8)	FAIBLE CONTENU EN CELLULES TUMORALES* (n = 16)
PCR-Séquençage	0	20	0	2
Therascreen	0	20	8	6
COLD-PCR Séquençage	0	20	8	6

Source : Tableau adapté de Carotenuto *et al.*, 2012.

*Le nombre de cellules tumorales est inférieur ou égal à 30 %.

Les échantillons classés non mutés (n = 8) ou mutés n = 20) par PCR le demeuraient lorsqu'ils étaient analysés par COLD-PCR et Therascreen. Toutefois, dans les 8 échantillons dont le statut mutationnel ne pouvait être déterminé par PCR, des mutations du gène *KRAS* ont été détectées lorsque la COLD-PCR ou le Therascreen étaient effectués avant le séquençage (tableau 2). L'utilisation de la PCR sur des échantillons comprenant moins de 30 % de cellules tumorales n'a

permis la détection que de 2 échantillons mutés (12,5 %), tandis que 6 échantillons mutés (37,5 %) étaient décelés en employant la COLD-PCR avant le séquençage ou la trousse Therascreen (tableau 2). La différence entre la performance des méthodes était significative avec une valeur $p < 0,0001$. La détection de la mutation G>C était bonifiée par la COLD-PCR, alors qu'elle était irréalisable par PCR. Il est à noter que la performance de détection était inchangée, même après l'utilisation d'une COLD-PCR rapide au lieu de la procédure complète.

Les auteurs concluent que la COLD-PCR est une technique à la sensibilité comparable à celle de la trousse commerciale Therascreen, et adéquate pour la détection des mutations dans les échantillons contenant moins de 30 % de cellules tumorales [Carotenuto *et al.*, 2012].

La COLD-PCR combinée à l'analyse de courbes de fusion : « high-resolution melting »

Pritchard et ses collaborateurs [2010] ont effectué le génotypage des codons 12 et 13 du gène *KRAS* par PCR ou COLD-PCR combinée à l'analyse de la courbe de fusion. Pour ce faire, 61 échantillons de tissus fixés au formaldéhyde et enrobés de paraffine (FFEP) ont été prélevés de tumeurs de patients atteints de cancer colorectal, desquels 14 avaient au préalable été analysés par séquençage dans un laboratoire externe.

Une concordance entre les données recueillies après la PCR ou la COLD-PCR a été rapportée pour 29/61 échantillons (48 %). Par ailleurs, 4 échantillons qui étaient classés non mutés ont été détectés mutés par COLD-PCR (33/61 échantillons; 54 %). En revanche, leur statut mutationnel n'a pu être confirmé par séquençage, mais plutôt à l'aide d'une trousse commerciale dont la sensibilité de détection était à moins de 1 % d'allèle muté. De plus, les 10 échantillons faiblement positifs après l'utilisation de la PCR sont devenus clairement positifs après la COLD-PCR (tableau 3).

Tableau 3 Performance de détection de mutations par PCR ou par COLD-PCR

POSITIFS		FAIBLES POSITIFS		NON MUTÉ	
PCR	COLD-PCR	PCR	COLD-PCR	PCR	COLD-PCR
19	33	10	0	32	28

Source : Tableau adapté de Pritchard *et al.*, 2010.

La sensibilité de l'analyse est 10 fois plus élevée en précédant l'analyse de courbes de fusion de la COLD-PCR. Les auteurs soulignent toutefois l'importance d'effectuer une étude où toutes les mutations rares du gène *KRAS* seraient détectées. Selon les auteurs, la COLD-PCR combinée à l'analyse de la courbe de fusion est assez sensible pour détecter les mutations du gène *KRAS* dans une tumeur contenant environ 3 % de cellules cancéreuses, et ce, sans effectuer une microdissection. En revanche, il demeure prudent de procéder à une dissection afin d'enrichir les échantillons en cellules tumorales.

Les auteurs concluent que l'incorporation de la COLD-PCR à une analyse de courbes de fusion présente une alternative pour la détection d'allèles rares à faible fréquence [Pritchard *et al.*, 2010].

Dans une étude similaire, Mancini et ses collaborateurs [2010] ont effectué la technique COLD-PCR combinée à la « high-resolution melting (HRM)⁶ » et au séquençage pour détecter entre autres les mutations du gène *KRAS* dans des échantillons de tissus tumoraux congelés provenant de patients atteints de cancer colorectal (n = 117). La COLD-PCR a été réalisée en utilisant deux procédures alternatives, à savoir une procédure abrégée « Fast COLD-PCR » et une complète « Full COLD-PCR ». La procédure abrégée révélait les allèles enrichis à la température de fusion, tandis que la COLD-PCR complète révélait les allèles permettant de maintenir ou d'augmenter la température de fusion dans le but d'en augmenter la sensibilité analytique [Mancini *et al.*, 2010].

L'analyse des échantillons par HRM et par séquençage a révélé la présence de mutations du gène *KRAS* dans 47/117 échantillons. L'utilisation de la Fast COLD-PCR dans une seconde phase de sélection des 70 patients avérés non porteurs de mutations a révélé 8 nouveaux échantillons portant des mutations du gène *KRAS*. L'application de la Full COLD-PCR a ensuite permis de déceler 2 autres cas mutés portant le nombre d'échantillons mutés à 57/117 patients (48,7 %). Un total de 10/70 échantillons (14,3 %), au préalable classés comme non porteurs de mutations du gène *KRAS* a pu être détecté en employant la COLD-PCR (tableau 4).

⁶ La « high resolution melting » est une analyse post-PCR employée pour détecter des variations dans les séquences d'acides nucléiques. La méthode est basée sur la détection de différences entre les courbes de fusion (information tirée de « A guide to high resolution melting (HRM) analysis » (2009), disponible à : <https://www.gene-quantification.de/ab-hrm-guide.pdf>).

Tableau 4 Statut mutationnel du gène *KRAS* dans 117 échantillons analysés par PCR ou COLD-PCR

GÈNE	CHANGEMENT NUCLÉOTIDIQUE	MUTATION	PCR	COLD PCR
<i>KRAS</i>	Non muté	s. o.	70	60
<i>KRAS</i> muté	c.35G>A	G12D	15	16
	c.35G>T	G12V	9	13
	c.38G>A	G13D	5	7
	c.34G>T	G12C	9	10
	c.35G>C	G12A	3	4
	c.34G>A	G12S	2	2
	c.57G>T	L19F	1	1
	c.37G>A	G13C	1	1
	c.64C>A	Q22K	1	1
	c.30_31insGGA	p.10_11insG	1	2
Total des mutations du gène <i>KRAS</i>	s. o.	s. o.	47	57

Source : Tableau adapté de Mancini *et al.*, 2010.

Abréviations : s. o. : Sans objet.

La sensibilité théorique a été déterminée à l'aide de dilutions sériees d'ADN prélevé de lignées cellulaires mutées (CCRF-CEM) ou non mutées (MCF-7). Les différentes fréquences mutationnelles testées pour analyser les allèles mutées étaient de 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,2 %, 3,1 %, 1,5 % et 0,8 %. Les échantillons étaient initialement analysés par PCR-conventionnelle (PCR) ou par la Fast COLD-PCR et la sensibilité de détection était évaluée par HRM et par séquençage.

Les résultats du HRM ont révélé une limite de détection près de huit fois supérieure en utilisant la COLD-PCR (0,8 %) que la PCR (6,2 %). De même à la suite du séquençage, les auteurs ont rapporté la limite de détection d'une fréquence mutationnelle allant de 3,1 % après la COLD-PCR à 12,5 % lorsqu'on utilisait la PCR (tableau 5).

Tableau 5 Limites de détection des mutations du gène *KRAS* en comparant la COLD-PCR à la PCR

MÉTHODE DE DÉTECTION	COLD-PCR	PCR
« high-resolution melting »	0,8 %	6,2 %
Séquençage	3,1 %	12,5 %

Source : Tableau adapté de Mancini *et al.*, 2010.

Selon les auteurs, l'amplification par COLD-PCR a été spécialement conçue pour détecter les mutations somatiques qui n'ont pu l'être après une PCR conventionnelle. L'étude montre que contrairement à la PCR-conventionnelle, la COLD-PCR combinée à la HRM est une technique qui augmente la sensibilité de détection des mutations du gène *KRAS*. La combinaison entre la COLD-PCR et la

HRM a permis de récupérer 14,3 % des patients initialement classés non porteurs de mutations dans le gène *KRAS* [Mancini *et al.*, 2010].

5.4. Données fournies par le demandeur

Échantillons : En 2015, le demandeur a effectué une première vague de validation à partir de 93 échantillons FFEP de patients ayant un cancer colorectal métastatique. Une deuxième vague de validation a ensuite été réalisée sur 255 échantillons du même type prélevés des patients de 2016 et 2017.

Méthode : Les 93 patients de la première vague sont testés avec les sondes d'hybridation FRET pour les mutations dans l'exon 2 (codons 12 et 13) et l'exon 3 (codons 59, 61 et 63) de *KRAS* et sont ensuite séquencés pour confirmer les résultats. Les 255 patients de la deuxième vague avaient initialement été testés avec les sondes d'hybridation FRET pour les mutations dans l'exon 2 (codons 12 et 13) et l'exon 3 (codons 59, 61 et 63) de *KRAS*. Les 140 patients qui étaient de type sauvage pour *KRAS* exons 2 et 3 ont ensuite été testés pour les mutations dans l'exon 4 (codon 146) de *KRAS* ainsi que pour les mutations dans l'exon 2 (codons 12 et 13), l'exon 3 (codons 59, 61 et 63) et l'exon 4 (codon 146) de *NRAS*. Tous les mutants potentiels et plusieurs types sauvages ont ensuite été analysés par séquençage pour confirmer les résultats.

Résultats de la première vague de validation pour *KRAS* exons 2 et 3

Concordance des résultats entre la PCR et le séquençage

Les 60 premiers patients ont tous été testés par PCR et par séquençage avec une concordance à 100 % des résultats tel que présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 Nombre de patients de type sauvage ou muté

STATUT MUTATIONNEL	PCR	SÉQUENÇAGE
Type sauvage	37	37
<i>KRAS</i> muté exon 2	21	21
<i>KRAS</i> muté exon 3	2	2

Source : Données de validation du demandeur.

Ensuite, les échantillons prélevés de 53 patients qui indiquaient la présence de mutation par PCR ont été séquencés pour confirmer la présence de mutations variées dans les codons ciblés (tableau 7). La mutation du codon 19 (L19F), qui est une variante connue mais peu fréquente a également été détectée.

Tableau 7 Type et fréquence des mutations de *KRAS* exons 2 et 3

MUTATION		NOMBRE DE PATIENTS
<i>KRAS</i> exon 2		
G12S	c.34G>A	2
G12R	c.34G>C	1
G12C	c.34G>T	5
G12D	c.35G>A	18
G12A	c.35G>C	4
G12V	c.35G>T	6
G12A + V14I	c.[35G>C; 40G>A]	1
G13R	c.37G>C	1
G13D	c.38G>A	10
L19F	c.57G>T	1
<i>KRAS</i> exon 3		
A59E	c.176C>A	2
Q61R	c.182A>G	1
Q61H	c.183A>C	3
Q61K	c.183_184delTCinsAA	1

Source : Données fournies par le demandeur.

Limites de détection

La limite de détection a été déterminée en diluant un mutant G13D à 100 % d'allèles mutés avec de l'ADN de type sauvage. La mutation a été détectée sans ambiguïté jusqu'à 3 % d'allèles mutés. À 1,5 % d'allèles mutés, il était encore possible de détecter la mutation, toutefois, le nombre de répliques a été augmenté pour atteindre un intervalle de confiance. Il est à noter que la limite de détection par séquençage de type Sanger est plus élevée (environ 15 %). Il serait donc impossible de confirmer la présence de ces mutations par séquençage.

Quantité d'ADN

Cette technique n'est pas dépendante de la quantité d'ADN et les concentrations d'ADN n'ont donc pas besoin d'être ajustées avant l'amplification. L'obtention des courbes identiques a été évaluée indépendamment des CP (Crossing Point) d'amplification qu'indiquerait une variation de plus de 100 fois la quantité initiale d'ADN. Toutefois, une quantité d'ADN très peu élevée risquerait de générer des pics plus petits qui seraient plus difficiles à interpréter. Un seuil d'acceptabilité pour la quantité et la qualité d'ADN a été établi.

Résultats de la deuxième vague de validation pour *KRAS* exon 4

Durant les années 2016 et 2017, 255 patients ont été testés pour la présence de mutations du gène *KRAS* dans les exons 2 et 3. Au total 107/255 patients étaient mutés dans l'exon 2 et 8/255 dans l'exon 3 de *KRAS*. Les 140 autres patients ont été testés pour la présence de mutation dans l'exon 4 du gène *KRAS* dont 11 étaient positifs (tableaux 8 et 9). Tous les mutants potentiels détectés par PCR ont été séquencés. Une concordance de 100 % entre la PCR et le séquençage a été obtenue.

Tableau 8 Type et fréquence des mutations dans l'exon 4 de KRAS

MUTATION		NOMBRE DE PATIENTS
A146T	c.436G>A	9
A146T	c.435_436delinsCA	1
A146V	c.437C>T	1

Source : Données fournies par le demandeur.

Résultats globaux et interprétation

La détection des mutations de *KRAS* par la technique des sondes d'hybridation FRET permet de détecter une grande variété de mutations, incluant les moins fréquentes qui ne sont pas couvertes par certaines trousse commerciales (tableau 9). Les résultats obtenus ont 100 % de concordance avec ceux du séquençage.

Tableau 9 Fréquence des génotypes

GENOTYPE	NOMBRE DE PATIENTS	POURCENTAGE PATIENTS (%)	NOMBRE DE MUTATIONS DIFFÉRENTES
Type sauvage	110	43	-
Muté <i>KRAS</i> exon 2	107	42	10
Muté <i>KRAS</i> exon 3	8	3	4
Muté <i>KRAS</i> exon 4	11	4	2

Source : Données fournies par le demandeur.

La limite de détection est de 3 % d'allèles mutés. Cette limite est un peu plus élevée que celle mesurée en utilisant la technique de PCR à allèle-spécifique, cependant les variantes rares peuvent être détectées. De plus, la détermination de la région tumorale par un pathologiste permet d'augmenter la proportion de tissu tumoral utilisé pour la recherche de mutations et il est rare que la proportion d'allèles mutés soit en bas de 20 %.

Limites de la méthode : La détection parallèle des 6 exons par PCR pourrait générer des coûts élevés. L'algorithme proposé est d'effectuer dans un premier temps la détection des mutations les plus fréquentes, soit celles de l'exon 2 du gène *KRAS*, qui ont été rapportées chez 42 % des patients. Ensuite, les échantillons négatifs sont analysés pour rechercher les mutations dans les 2 exons restants de *KRAS* et les 3 exons de *NRAS*. Cet algorithme ajouterait un délai de 24 heures aux 24 heures qui sont normalement nécessaires pour effectuer l'analyse.

Selon le demandeur, la méthode développée pour détecter les mutations de *KRAS* et *NRAS* détient la spécificité et la sensibilité adéquate pour aider à déterminer la pertinence d'inclure un anti-EGFR au plan de traitement du cancer colorectal.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire n'a pas été réalisée dans ce dossier puisque l'analyse existe déjà dans le *Répertoire* avec une valeur pondérée de 94 qui est passée à 120 pour la période 2018-2019. Il s'agit d'une désignation complémentaire pour la détection des mutations du gène *KRAS*.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

- Le respect du temps de réponse de 10 jours représente un enjeu pour la période d'instauration du traitement. Dans la présente analyse, le demandeur propose d'effectuer dans un premier temps la détection des mutations de l'exon le plus fréquent dans *KRAS* (exon 2) pour ensuite rechercher uniquement au sein des échantillons négatifs les mutations des exons 3, 4 de *KRAS* et 2, 3, 4 de *NRAS*. L'analyse en deux étapes consécutives pourrait prolonger les délais de réalisation. Toutefois, le temps requis pour la première étape de l'analyse étant initialement de 24 heures, selon le demandeur, il serait prolongé de 24 heures supplémentaires pour tester dans une deuxième étape les cinq exons restants des échantillons négatifs.
- La quantité de cellules tumorales d'un échantillon pourrait influencer la méthode utilisée pour détecter les mutations. De ce fait, des échantillons <30 % de cellules tumorales pourraient être détectés par une méthode plus sensible afin d'identifier les mutations, ce qui n'est pas le cas si leur nombre est supérieur à 30 % impliquant l'utilisation d'une technique moins sensible [Carotenuto *et al.*, 2012].

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

Le NCCN a établi des principes d'examens pathologiques qui préconisent :

- le génotypage du gène *KRAS* (exon 2, 3,4) à partir des tissus tumoraux, chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique;
- l'analyse des mutations du gène *KRAS* devrait être effectuée uniquement dans les laboratoires certifiés CLIA-88 pour effectuer des analyses cliniques de haute complexité;
- l'utilisation de tissus enrobés de paraffine, fixés au formaldéhyde et prélevés de tumeurs primaires ou des métastases [Benson *et al.*, 2018].

American Society of Clinical Oncology (ASCO)

Selon l'ASCO un comité ad hoc du CAP a défini les conditions d'analyse du gène *KRAS*. Les échantillons de tissus tumoraux devront être sélectionnés par un pathologiste afin d'inclure les cellules tumorales prédominantes sans nécrose ou inflammation notable. Le choix de la méthode pour effectuer le test dépend de celle que le laboratoire utilise de façon routinière [Allegra *et al.*, 2009].

L'ASCO met à jour ses recommandations en soulignant l'importance d'analyser non seulement l'exon 2 du gène *KRAS* (codon 12 et 13), mais aussi les exons 3 (codons 59 et 61) et 4 (codons 117 et 146) [Allegra *et al.*, 2016].

Groupe d'experts canadiens

Récapitulatif des recommandations d'un groupe d'experts canadiens composé d'oncologues du système gastro-intestinal, de généticiens et de pathologistes [Aubin *et al.*, 2011] suivant les catégories de consensus rapportées dans le tableau 10 :

Tableau 10 Catégories des consensus

ECHELLE	DÉFINITION
1	Consensus uniforme basé sur un niveau d'évidence montrant que la recommandation est appropriée.
2A	Consensus uniforme basé sur un bas niveau d'évidence, incluant une expérience clinique montrant que la recommandation est appropriée.
2B	Consensus non uniforme sans désaccord majeur, basé sur un bas niveau d'évidence, incluant une expérience cliniques montrant que la recommandation est appropriée.
3	Désaccord majeur sur l'importance de la recommandation.

Source : Tableau adapté de Aubin *et al.*, 2011.

Indications et financement de l'analyse du gène *KRAS*

KRAS est un bio-marqueur prédictif pour un traitement avec des anti-EGFR. Le statut mutationnel du gène *KRAS* doit être déterminé lorsqu'un anti-EGFR est envisagé pour le traitement de cancer colorectal métastatique (1). Il est important de restreindre l'analyse du gène *KRAS* à un cas métastatique pour lequel les résultats de l'analyse influenceraient directement la prise en charge clinique (2A).

Déroulement de l'analyse

Dans le cas où l'analyse du statut mutationnel de *KRAS* ne serait pas concluante, les experts recommandent aux cliniciens de présenter aux patients le bénéfice d'envisager de recevoir un traitement anti-EGFR (2A).

Analyse optimale pour déterminer le statut mutationnel de *KRAS*

Les stratégies de détection des mutations du gène *KRAS* ne sont acceptables que si elles répondent minimalement aux exigences de sensibilité (entre 95 et 99 %), et de spécificité (100 %). L'analyse de *KRAS* doit être reproductible et réalisée dans un laboratoire accrédité et conforme aux lignes directrices de qualité pour effectuer l'analyse, et qui participe de façon routinière à des tests de compétence tels que celui offert par le « College of American Pathologists », avec validation externe (2A) [Aubin *et al.*, 2011].

Exigences à observer pour rapporter les résultats d'analyse

L'absence ou la présence de mutations dans le gène *KRAS* doit être rapportée. Si au moins une mutation est détectée, le codon affecté et si possible le changement nucléotidique doivent être spécifiés. La nomenclature exacte devrait être utilisée lors du rapport des résultats. Le rapport des résultats doit décrire la méthode utilisée. Les rapports doivent se conformer aux lignes directrices de « l'American College of Medical Genetics », du « College of American Pathologists » et le « Canadian College of Medical Geneticists » (2A).

Temps de réponse acceptable

Une fois que l'échantillon à analyser est reçu au laboratoire, un délai de 10 jours ouvrables est le temps de réponse acceptable pour rapporter les résultats au médecin requérant (2A) [Aubin *et al.*, 2011].

Lignes directrices sur les biomarqueurs moléculaires pour l'évaluation d'un cancer colorectal : American Society for Clinical Pathology (ASCP), College of American Pathologists (CAP), Association for Molecular Pathology (AMP), et American Society of Clinical Oncology (ASCO)

Les différents niveaux de recommandations de l'ASCP, du CAP, de l'AMP et de l'ASCO ont été rapportés dans le tableau 11.

Tableau 11 Description de la force de recommandation

DÉSIGNATION	DESCRIPTION	Raisonnement
Recommandation forte	Recommandation pour ou contre un test moléculaire particulier pour le cancer colorectal (peut inclure « doit » ou « devrait »)	Preuves convaincantes ou adéquates de haute qualité ou de qualité intermédiaire avec des bénéfices clairs écartant tout inconvénient
Recommandation	Recommandation pour ou contre la pratique d'un test moléculaire particulier du cancer colorectal (peut inclure « devrait » ou « pourrait »)	Quelques limites de la force des preuves (adéquate ou inadéquade) et de la qualité des preuves (intermédiaire ou faible), équilibre entre les bénéfices et les inconvénients, les valeurs ou coûts, le groupe d'experts conclut néanmoins qu'il existe assez de preuves ou de bénéfices pour émettre une recommandation
Opinion du consensus d'experts	Recommandation pour ou contre la pratique d'un test moléculaire particulier du cancer colorectal (peut inclure « devrait » ou « pourrait »)	Limites importantes dans la force des preuves (inadéquat ou insuffisant), qualité des preuves (intermédiaire ou faible), l'équilibre des bénéfices et des inconvénients, les valeurs, ou coûts, le consensus d'experts trouvent néanmoins nécessaire de produire une déclaration
Pas de recommandation	Pas de recommandation pour ou contre un test moléculaire particulier pour le cancer colorectal	Preuve ou entente insuffisante sur l'équilibre entre les bénéfices, les inconvénients, les valeurs ou coûts pour pouvoir émettre une recommandation

Source : Tableau adapté de Sepulveda *et al.*, 2017.

L'ASCP, le CAP, l'AMP et l'ASCO s'accordent pour publier les recommandations suivantes :

- L'analyse du statut mutationnel des gènes *RAS*, notamment les codons 12 et 13 de l'exon 2; 59 et 61 de l'exon 3 et 117 et 146 de l'exon 4 du gène *KRAS* (recommandation).
- L'utilisation d'une méthode de détection des marqueurs du cancer colorectal qui permettrait la détection de mutations dans des échantillons avec moins de 5 %

de fréquence d'allèle muté, en tenant compte de la sensibilité technique et de l'enrichissement de cellules tumorales (opinion du consensus d'experts).

- L'accessibilité la plus rapide possible des résultats de détection de marqueurs moléculaires du cancer colorectal afin d'effectuer la décision thérapeutique. Il est à noter que 90 % des rapports doivent être produits par les laboratoires dans les 10 jours ouvrables à compter de la date de réception des échantillons (opinion du consensus d'experts) [Sepulveda *et al.*, 2017].

Alberta Health Services

L'équipe provinciale de tumeurs gastrointestinale recommande de rechercher des mutations activatrices des gènes *RAS* (*KRAS* et *NRAS*) dans les tissus tumoraux des patients atteints de cancer colorectal métastatique lorsqu'un diagnostic de stade IV est posé. Elle soutient également l'utilisation d'inhibiteurs EGFR dans les traitements de première intention des patients atteints de cancer colorectal métastatique et porteurs de gènes *RAS* non mutés [AHS, 2018].

Japanese Society of Medical Oncology

La société japonaise d'oncologie médicale recommande fortement l'analyse des mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* avant l'instauration d'un traitement anti-EGFR chez les patients atteints de cancer colorectal non résécable, avancé ou récurrent. Elle recommande également la réalisation de tests génétiques pour le traitement du cancer colorectal, dans des laboratoires dont la conformité aux exigences en matière de contrôle de la qualité est démontrée [Yamazaki *et al.*, 2018].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Détection de mutations du gène *KRAS* par TAAN

La recommandation de l'INESSS

Considérant qu'il s'agit d'une demande de désignation complémentaire pour une analyse déjà au *Répertoire*, les données de validation analytique ont été jugées :

- ☐ Complètes
- ☒ Incomplètes

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité clinique de l'analyse est reconnue.
- ✓ Quelques éléments sont requis pour compléter la validation :
 - données de reproductibilité dans le temps (intra- inter-essais);
 - présenter les biais, les données de recouvrement, de sensibilité, et de spécificité;
 - effectuer l'analyse avec des spécimens positifs;
 - utiliser si possible du matériel certifié ou provenant d'un programme externe.
- ✓ L'INESSS recommande au laboratoire demandeur de mettre en place un mécanisme de contrôle de qualité externe (échanges d'échantillons avec d'autres laboratoires désignés pour cette analyse).

RÉFÉRENCES

- Alberta Health Services (AHS). Metastatic colorectal cancer. Clinical Practice Guideline GI-003. Edmonton, AB : AHS; 2018. Disponible à : <https://www.albertahealthservices.ca/assets/info/hp/cancer/if-hp-cancer-guide-gi003-colorectal-metastatic.pdf>.
- Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, Schilsky RL. Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion update 2015. *J Clin Oncol* 2016;34(2):179-85.
- Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: Testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27(12):2091-6.
- Aubin F, Gill S, Burkes R, Colwell B, Kamel-Reid S, Koski S, et al. Canadian Expert Group consensus recommendations: KRAS testing in colorectal cancer. *Curr Oncol* 2011;18(4):e180-4.
- Benson AB 3rd, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 2018;16(4):359-69.
- Benson AB 3rd, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, et al. Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15(3):370-98.
- BlueCross BlueShield (BCBS) of Louisiana. KRAS, NRAS and BRAF mutation analysis in metastatic colorectal cancer. Baton Rouge, LA : BCBS; 2017. Disponible à : <https://pdfs.semanticscholar.org/b729/0431f7f073fc41dc3d8c07d4046a0a299b19.pdf>.
- Bristol-Myers Squibb Canada. Erbitux^{MC} en association avec la chimiothérapie maintenant approuvé au Canada comme traitement de première intention chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique [communiqué de presse]. Montréal, Qc : Bristol-Myers Squibb Canada; 2013. Disponible à : <https://www.newswire.ca/fr/news-releases/erbituxmc-en-association-avec-la-chimiotherapie-maintenant-approuve-au-canada-comme-traitement-de-premiere-intention-chez-les-patients-atteints-de-cancer-colorectal-metastatique-511828901.html>.
- Carotenuto P, Roma C, Cozzolino S, Fenizia F, Rachiglio AM, Tatangelo F, et al. Detection of KRAS mutations in colorectal cancer with Fast COLD-PCR. *Int J Oncol* 2012;40(2):378-84.

- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(8):753-62.
- Dienstmann R et Tabernero J. Spectrum of gene mutations in colorectal cancer: Implications for treatment. *Cancer J* 2016;22(3):149-55.
- Hawkes E et Cunningham D. Relationship between colorectal cancer biomarkers and response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2010;28(28):e529-31; author reply e532-3.
- Hsu H-C, Thiam TK, Lu Y-J, Yeh CY, Tsai W-S, You JF, et al. Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2016;7(16):22257-70.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Avis au Ministre de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux pour la mise à jour des listes des médicaments (Erbix^{MC} p. 225-8 et Vectibix^{MC} p. 263-7). Québec, Qc : INESSS; 2018a. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Fevrier_2018/AvisMinistre_Web_2018_02.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Analyse combinée des gènes KRAS-NRAS-BRAF par séquençage de nouvelle génération pour le traitement du cancer colorectal métastatique. Québec, Qc : INESSS; 2018b. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Mars_2018/INESSS_Avis_Analyse-combinee-genes-KRAS-NRAS-BRAF.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) et Groupe d'étude en oncologie du Québec (GÉOQ). Algorithmes d'investigation de traitement et de suivi – Cancer du côlon (mise à jour). Québec, Qc : INESSS et GÉOQ; 2016. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Rapports/Oncologie/INESSS_Algorithme_traitement_cancer_colon.pdf.
- Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* 2008;14(5):579-84.
- Mancini I, Santucci C, Sestini R, Simi L, Pratesi N, Cianchi F, et al. The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2010;12(5):705-11.
- Mariani S, Bertero L, Osella-Abate S, Di Bello C, Francia di Celle P, Coppola V, et al. Extreme assay sensitivity in molecular diagnostics further unveils intratumour heterogeneity in metastatic colorectal cancer as well as artifactual low-frequency mutations in the KRAS gene. *Br J Cancer* 2017;117(3):358-66.

- Pritchard CC, Akagi L, Reddy PL, Joseph L, Tait JF. COLD-PCR enhanced melting curve analysis improves diagnostic accuracy for KRAS mutations in colorectal carcinoma. *BMC Clin Pathol* 2010;10:6.
- Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141(5):625-57.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer. Sujet particulier : Le cancer du pancréas. Toronto, ON : SCC; 2017. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2017-FR.pdf>.
- Yamazaki K, Taniguchi H, Yoshino T, Akagi K, Ishida H, Ebi H, et al. Japanese Society of Medical Oncology clinical guidelines: Molecular testing for colorectal cancer treatment, third edition. *Cancer Sci* 2018;109(6):2074-9.

DÉTECTION DE MUTATIONS DU GÈNE *NRAS* PAR TAAN (RÉFÉRENCE – 2018.03.005V)

Avis d'évaluation

(Désignation complémentaire)

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CHU de Québec – Université Laval

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Tous les membres du comité présents à la rencontre ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

2. RÉSUMÉ

	Détection de mutations du gène <i>NRAS</i> par TAAN
Demandeur	CHU de Québec – Université Laval.
Nom et objectif de l'analyse	– Détection de mutations du gène <i>NRAS</i> par TAAN pour déterminer l'admissibilité des patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRm) à un traitement anti-EGFR. Analyse maison reposant sur la méthode COLD-PCR.
Situation actuelle	• En cas d'absence de mutation somatique dans le gène <i>KRAS</i> une recherche subséquente de mutation dans le gène <i>NRAS</i> est effectuée. • La détection des mutations du gène <i>NRAS</i> figure actuellement dans le <i>Répertoire</i> (code 65149). • Elle est réalisée avec une trousse commerciale ou repose sur d'autres types de TAAN. • Les mutations du gène <i>NRAS</i> sont également détectées dans l'analyse révélant les mutations des gènes <i>KRAS</i>, <i>NRAS</i> et <i>BRAF</i> par SNG (code 65003).
Nombre d'analyses prévues	75 tests par an pour l'est du Québec.
Valeur diagnostique	L'analyse n'a pas pour objectif d'établir ou de confirmer un diagnostic.
Valeur thérapeutique et pronostique	Le recours à un traitement anti-EGFR est associé à un bénéfice clinique chez les patients atteints d'un CCRm et dont la tumeur est exempte de mutations somatiques dans <i>KRAS</i> et <i>NRAS</i> .
Validité analytique	La recherche documentaire n'a relevé aucune étude pertinente au sujet de l'utilisation de la COLD-PCR dans la détection des mutations du gène <i>NRAS</i> chez les patients avec un cancer colorectal métastatique.
Impact budgétaire	• Aucune analyse d'impact budgétaire n'a été effectuée. • La VP indiquée pour cette analyse (108,44) est inférieure à celle qui est actuellement dans le <i>Répertoire</i> (198,00).
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	• Le NCCN (National Comprehensive Cancer Network), l'ASCO (American Society of Clinical Oncology), l'ASCP (American Society for Clinical Pathology), le CAP (College of American Pathologists), l'AMP (Association of Molecular Pathology) recommandent d'effectuer la détection de mutations dans <i>NRAS</i> chez les patients atteints de CCRm et susceptibles de recevoir des anti-EGFR. • Le AHS (Alberta Health Services) recommande la recherche de mutations activatrices des gènes <i>RAS</i> dans les tissus tumoraux des patients qui reçoivent un diagnostic de CCRm. • La société japonaise d'oncologie médicale recommande fortement l'analyse des mutations dans <i>NRAS</i> avant l'instauration d'un traitement anti-EGFR chez les patients avec un CCRm.
Enjeux particuliers	Respect du temps de réponse recommandé à 10 jours ouvrables.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

La détection des mutations des exons 2, 3, et 4 du gène *NRAS* par analyse de la courbe de dénaturation suivant l'amplification des acides nucléiques (TAAN), est effectuée chez les patients présentant un cancer colorectal métastatique (CCRM), afin de déterminer leur admissibilité au traitement anti-EGFR (cétuximab, panitumumab).

3.2. Description de la méthode

L'analyse évaluée dans cet avis permet la détection des mutations par le biais des sondes d'hybridation FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) associée à la COLD-PCR (coamplification at lower denaturation temperature PCR). Cette technologie est basée sur la PCR en temps réel «Real-time PCR», qui permet de détecter des mutations dont la nature et l'emplacement peuvent varier. Elle repose également sur l'amplification de chaque exon cible de l'ADN, pour ensuite réaliser une courbe de dénaturation en présence d'une paire de sondes d'hybridation. L'appariement est effectué entre les sondes et la séquence d'ADN sauvage tandis qu'il existe un mésappariement entre celles-ci et la séquence mutée. De ce fait, les températures choisies pour la fusion des sondes à la séquence sauvage ou à la séquence mutée sont différentes et génèrent deux pics distincts de fusion (figure 1). La modification COLD-PCR apportée au protocole permet de favoriser l'amplification des allèles mutés augmentant ainsi la sensibilité de la détection grâce aux réductions de températures de dénaturation (source : document de validation fourni par le laboratoire demandeur).

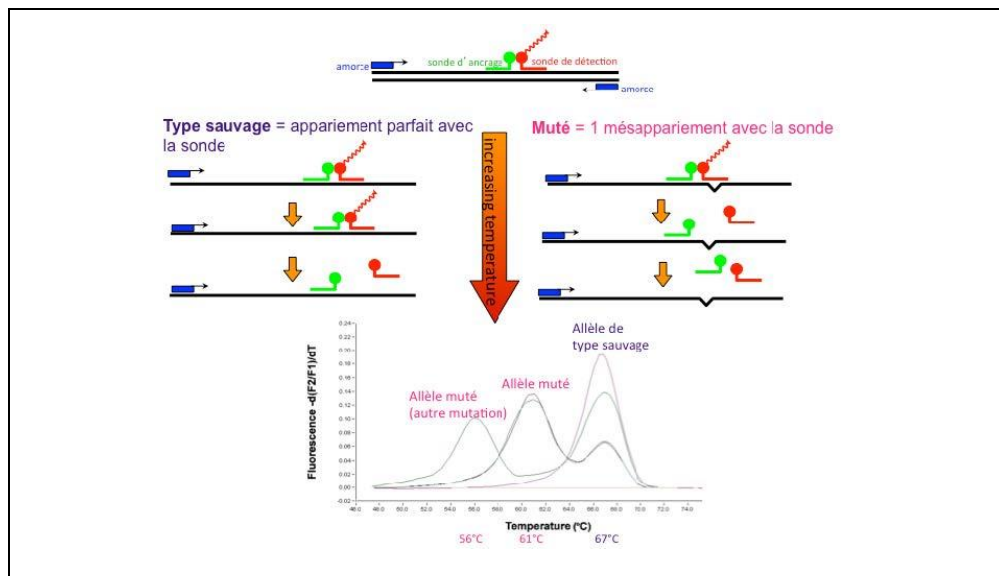


Figure 1 Détection de mutations par les sondes d'hybridation FRET

Source : Données de validation fournies par le laboratoire demandeur.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Une fois que l'identification des patients ciblés par le médecin traitant est effectuée, la demande d'analyse est transférée au laboratoire de pathologie avec les spécimens néoplasiques. Une extraction de l'ADN et l'analyse mutationnelle de *KRAS* sont effectuées à la suite de la réception du spécimen au laboratoire. Dans le cas où *KRAS* serait non muté, on procéderait à l'analyse du *NRAS* complémentaire à l'analyse préalable des mutations de *KRAS*.

Algorithme

Une recherche de mutations dans le gène *KRAS* doit être effectuée de façon systématique chez tous les patients candidats à une thérapie avec un anti-EGFR. Il s'agit du test initial puisque 40 % des mutations se retrouvent dans les exons 2, 3, 4 du gène *KRAS*. Une recherche subséquente est ensuite effectuée chez les patients non mutés pour *KRAS*, pour détecter les mutations du gène *NRAS* représentant 5 % à 10 % de mutants supplémentaires.

Temps de réponse

Moins de 10 jours ouvrables.

3.4. Société ou concepteur

Il s'agit d'une analyse maison.

3.5. Homologation

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont fait l'objet d'aucune homologation par Santé Canada ou la Food and Drug Administration (FDA).

3.6. Valeur pondérée : 108,44

Les valeurs pondérées des analyses 65149 et 65003 permettant de rechercher les mutations de *NRAS* dans le cancer colorectal et inscrites dans le *Répertoire* sont respectivement de 198,00 et 390,00.

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (CCRm) pour lesquels un traitement anti-EGFR est envisagé et qui ne portent aucune mutation dans le gène *KRAS*.

4.2. Description de la maladie visée

Incidence du cancer colorectal

Selon les statistiques canadiennes sur le cancer, le cancer colorectal est le deuxième en importance, représentant 13 % de tous les cancers. En 2017 au Canada, 14,5 % des nouveaux cas de cancers chez les hommes et 11,5 % chez les femmes étaient colorectaux [SCC, 2017]. Une projection de 2017 au Québec révèle que 3 800 hommes et 3 000 femmes auraient reçu un diagnostic de cancer colorectal et que respectivement 1 350 et 1 200 en mourraient. Le cancer colorectal représente 12 % de tous les décès attribuables au cancer [SCC, 2017].

Mutations du gène *NRAS*

Les mutations du gène *NRAS* sont rencontrées dans approximativement 2 % à 7 % des tumeurs colorectales [BCBS, 2017; Dienstmann et Tabernero, 2016]. La présence de mutations de *KRAS* et *NRAS* situées dans les exons 2 (codons 12 et 13), 3 (codons 59 et 61) et 4 (codons 117 et 146) prédit un échec au traitement avec un anti-EGFR [BCBS, 2017; INESSS et GÉOQ, 2016]. Il est à noter que les mutations des gènes *RAS* sont mutuellement exclusives, à l'exception de cas rares où elles coexistent [Hsu *et al.*, 2016; De Roock *et al.*, 2010; Hawkes et Cunningham, 2010].

Prise en charge et traitement

Le cancer colorectal est associé à la surexpression cellulaire du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor), ce qui en fait la cible de traitements spécifiques. De ce fait, les traitements ERBITUX^{MC} (cétuximab) et VECTIBIX^{MC} (panitumumab) des anticorps monoclonaux anti-EGFR ont démontré un bénéfice de survie chez les patients atteints de CCRm [INESSS et GÉOQ, 2016; Bristol-Myers, 2013]. Au Québec, le cétuximab et le panitumumab sont administrés en monothérapie pour le traitement de troisième intention du cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR chez les personnes avec un gène *RAS* non muté, un statut de performance selon l'ECOG de 0 à 2; et réfractaires aux chimiothérapies à base d'irinotécan et d'oxaliplatine et qui ont reçu un traitement par fluoropyrimidine [INESSS, 2018a]. De plus, le statut mutationnel des gènes *KRAS* et *NRAS* est reconnu comme outil de sélection des patients atteints de CCRm grâce à leur potentiel prédictif de la réponse à un traitement anti-EGFR [Benson *et al.*, 2017; BCBS, 2017; INESSS et GÉOQ, 2016].

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur prévoit entre 70 et 75 tests par an pour la région de Québec et l'est du Québec, ce qui correspondrait à 50 % des cas de cancer colorectal ne portant pas de mutations dans le gène *KRAS*.

4.4. Situation actuelle

Il s'agit d'une désignation complémentaire pour la détection des mutations du gène *NRAS* qui figure déjà dans le *Répertoire* sous le code 65149. Les mutations de *NRAS* sont également détectées dans une analyse de séquençage de nouvelle génération combinée à *KRAS* et *BRAF* et figurant également au *Répertoire* sous le code 65003. Le laboratoire requérant n'effectue pas l'analyse des mutations du gène *NRAS*. En cas d'absence de mutations dans *KRAS*, les échantillons sont acheminés à l'Hôpital général juif de Montréal (CUSM) pour la détection des mutations du gène *NRAS*. L'analyse du statut mutationnel des exons 2, 3, 4 du gène *NRAS* fait partie des standards de pratique auprès des patients atteints de cancer colorectal métastatique et considérés pour un traitement anti-EGFR [Benson *et al.*, 2018; Sepulveda *et al.*, 2017; INESSS et GÉOQ, 2016].

4.5. Données médico administratives

L'analyse Cancer du côlon; *NRAS*, recherche de mutations ciblées (exons 2, 3, 4; codons 12,13, 61 et 146) (TAAN) figure dans le *Répertoire* sous le code 65149. Les données médico administratives de cette analyse sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 Données médico administratives de l'analyse du gène *NRAS* (65149)

ANNEE-ADMINISTRATIVE	VALEUR PONDÉRÉE [‡]	NOMBRE D'ANALYSES	TOTAL DES COÛTS (\$)
2017-2018*	198	907	179 586

Source : Données du ministère de la Santé et des Services sociaux.

*L'établissement rapporté est le CIUSSS du Centre-Ouest-de-l' île-de-Montréal

Par ailleurs, la détection des mutations du gène *NRAS* fait également partie d'une analyse combinée des gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* récemment évaluée par l'INESSS avec comme numéro de référence 65003, et pour laquelle aucune donnée médico administrative n'a encore été rapportée.

4.6. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, l'analyse permettrait :

- d'enrichir toutes mutations, même rares, de plusieurs codons voisins en une réaction PCR;
- d'évaluer le statut mutationnel du gène *NRAS* qui est un prérequis pour le choix d'administrer ou non un anti-EGFR au Québec;
- d'optimiser le diagnostic et le traitement en sélectionnant les patients susceptibles de répondre à un traitement anti-EGFR, en limitant les toxicités et les coûts. Il s'avère essentiel d'amorcer aussi rapidement que possible la thérapie chez les patients métastatiques;
- serait simple, sensible et nécessiterait l'utilisation d'un équipement déjà en place dans le laboratoire. Elle est identique à celle utilisée pour détecter les mutations du gène *KRAS*.

4.7. Assurance qualité

Les soixante premiers patients ont été analysés en parallèle par la méthode de séquençage Sanger, avec une concordance de 100 % entre les deux méthodes. Dans la routine, le laboratoire demandeur utilise des contrôles positifs et négatifs lors de chaque analyse. Pour la détection des mutations dans *NRAS*, le demandeur effectuera régulièrement le séquençage des patients et prévoit participer deux fois par année au programme « Multigene Tumor Panel (MTP) » du contrôle de qualité externe du CAP (College of American Pathologists). Ce programme consiste à tester, deux fois par année, trois échantillons envoyés par le CAP et constitués de tissus fixés au formaldéhyde et enrobés de paraffine (FFEP).

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif d'établir ou de préciser un diagnostic.

5.2. Valeur pronostique et thérapeutique

L'association entre l'absence de mutations somatiques dans le gène *NRAS* des personnes atteintes de CCRm et l'avantage clinique d'un traitement anti-EGFR a été étayée par la documentation repérée dans les avis d'évaluation publiés par l'INESSS [INESSS, 2018a; INESSS, 2018b; INESSS, 2016].

5.3. Validité analytique

La recherche documentaire n'a relevé aucune étude pertinente au sujet de l'utilisation de la COLD-PCR dans la détection des mutations du gène *NRAS* chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique. De ce fait, la performance analytique de l'utilisation du test dans la détection des mutations des exons 2, 3, et 4 du gène *NRAS*, repose essentiellement sur les données fournies par le demandeur.

5.4. Données fournies par le demandeur

Échantillons : En 2015, le demandeur a effectué une première vague de validation à partir de 93 tissus FFEP de patients ayant un cancer colorectal métastatique. Une deuxième vague de validation a ensuite été réalisée sur 255 échantillons du même type prélevés des patients de 2016 et 2017.

Méthode : Des 255 patients initialement testés, les 140 patients qui étaient de type sauvage pour *KRAS* exons 2 et 3 ont ensuite été testés pour les mutations dans l'exon 4 (codon 146) de *KRAS* ainsi que pour les mutations dans l'exon 2 (codons 12 et 13), l'exon 3 (codons 59, 61 et 63) et l'exon 4 (codon 146) de *NRAS*. Tous les mutants potentiels et plusieurs types sauvages ont ensuite été analysés par séquençage pour confirmer les résultats (tableau 2).

Tableau 2 Nombre de patients de type sauvage ou muté

MUTATION	PCR	% CONCORDANCE PCR-SÉQUENÇAGE
Type sauvage	110	100 %
Muté <i>KRAS</i> exon 4	11	100 %
Muté <i>NRAS</i> exon 2	10	100 %
Muté <i>NRAS</i> exon 3	9	100 %
Muté <i>NRAS</i> exon 4	0	100 %

Source : Données fournies par le demandeur.

Résultats de validation pour la détection des mutations des exons 2, 3, et 4 du gène *NRAS*

Durant les années 2016 et 2017, 255 patients ont été testés pour la présence de mutations du gène *KRAS* dans les exons 2 et 3, et 107 portaient des mutations dans

le gène *KRAS*. Les 140 autres patients ont été testés pour la présence de mutation dans l'exon 4 du gène *KRAS* et dans les exons 2, 3, et 4 du gène *NRAS* (tableau 3). Tous les mutants potentiels détectés par PCR ont été séquencés. Une concordance de 100 % entre la PCR et le séquençage a été obtenue (tableau 2). Les mutations détectées dans les exons 2 et 3 du gène *NRAS* et leur fréquence sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 Type et fréquence des mutations de *NRAS* exons 2 et 3

MUTATION		NOMBRE DE PATIENTS
<i>NRAS</i> exon 2		
G12S	c.34G>A	2
G12C	c.34G>T	1
G12D	c.35G>A	3
G12V	c.35G>T	1
G13S	c.37G>A	1
G13D	c.38G>A	2
<i>NRAS</i> exon 3		
Q61K	c.181C>A	3
Q61E	c.181C>G	1
Q61R	c.182A>G	3
Q61L	c.182A>T	1
E63K	c.187G>A	1

Source : Données de validation fournies par le demandeur.

Résultats et interprétation

La détection des mutations de *NRAS* par la technique des sondes d'hybridation FRET permet de détecter une grande variété de mutations, y compris les moins fréquentes qui ne sont pas couvertes par certaines trousse commerciales (tableau 4).

Tableau 4 Fréquence des génotypes

GENOTYPE	NOMBRE DE PATIENTS	POURCENTAGE PATIENTS (%)	NOMBRE DE MUTATIONS DIFFÉRENTES
Type sauvage	110	43	-
Muté <i>NRAS</i> exon 2	10	4	6
Muté <i>NRAS</i> exon 3	9	4	6
Muté <i>NRAS</i> exon 4	0	0	0

Source : Données de validation fournies par le demandeur.

La limite de détection est de 3 % d'allèles mutés. Cette limite est un peu plus élevée que celle mesurée en utilisant la technique de PCR à allèle-spécifique. Les variantes

rare peuvent néanmoins être détectées. De plus, la détermination de la région tumorale par un pathologiste permet d'augmenter la proportion de tissu tumoral utilisé pour la recherche de mutations et il est rare que la proportion d'allèles mutés soit en dessous de 20 %.

Limites de la méthode : La détection parallèle des 6 exons par PCR pourrait générer des coûts élevés. L'algorithme proposé est d'effectuer dans un premier temps la détection des mutations les plus fréquentes, soit celles de l'exon 2 du gène *KRAS*, qui ont été rapportées chez 42 % des patients. Ensuite, les échantillons négatifs sont analysés pour rechercher les mutations dans les 5 exons restants des gènes *KRAS* et *NRAS*. Cet algorithme ajouterait un délai de 24 heures aux 24 heures qui sont normalement nécessaires pour effectuer l'analyse.

Selon le demandeur, la méthode développée pour détecter les mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* détient la spécificité et la sensibilité adéquate pour aider à la pertinence d'inclure un anti-EGFR au plan de traitement du cancer colorectal.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire n'a pas été réalisée dans ce dossier puisque l'analyse existe déjà dans le *Répertoire* avec une valeur pondérée de 198,00. La valeur pondérée de l'analyse évaluée dans cet avis est de 108,44. Il s'agit d'une désignation complémentaire pour la détection des mutations du gène *NRAS*.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Le respect du temps de réponse de 10 jours représente un enjeu pour la période d'instauration du traitement. Dans la présente analyse, le demandeur propose d'effectuer dans un premier temps la détection des mutations de l'exon le plus fréquent dans *KRAS* (exon 2) pour ensuite rechercher uniquement au sein des échantillons négatifs les mutations des exons 3, 4 de *KRAS* et 2, 3, 4 de *NRAS*. L'analyse en deux étapes consécutives pourrait prolonger les délais de réalisation. Toutefois, le temps requis pour la première étape de l'analyse étant initialement de 24 heures, selon le demandeur, il serait prolongé de 24 heures supplémentaires pour tester dans une deuxième étape les cinq exons restants des échantillons négatifs.

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

Le NCCN a établi des principes d'examen pathologiques qui préconisent :

- Le génotypage du gène *NRAS* (exon 2, 3, 4) à partir des tissus tumoraux, chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique.
- L'analyse des mutations du gène *NRAS* devrait être effectuée uniquement dans les laboratoires certifiés CLIA-88 pour effectuer des analyses cliniques de haute complexité.
- L'utilisation de tissus enrobés de paraffine, fixés au formaldéhyde et prélevés de tumeurs primaires ou des métastases [Benson *et al.*, 2018].

American Society of Clinical Oncology (ASCO)

Selon l'ASCO un comité ad hoc du CAP a défini les conditions d'analyse du gène *KRAS*. Les échantillons de tissus tumoraux devront être sélectionnés par un pathologiste afin d'inclure les cellules tumorales prédominantes sans nécrose ou inflammation notable. Le choix de la méthode pour effectuer le test dépend de celle que le laboratoire utilise de façon routinière [Allegra *et al.*, 2009].

L'ASCO met à jour ses recommandations en soulignant l'importance d'analyser les gènes RAS (*KRAS* et *NRAS*), soit l'exon 2 (codons 12 et 13), mais aussi les exons 3 (codons 59 et 61) et 4 (codons 117 et 146) [Allegra *et al.*, 2016].

Lignes directrices sur les biomarqueurs moléculaires pour l'évaluation d'un cancer colorectal : American Society for Clinical Pathology (ASCP), College of American Pathologists (CAP), Association for Molecular Pathology (AMP), et American Society of Clinical Oncology (ASCO)

Les différents niveaux de recommandations de l'ASCP, du CAP, de l'AMP et de l'ASCO ont été rapportés dans le tableau 5.

Tableau 5 Description de la force de recommandation

DÉSIGNATION	DESCRIPTION	Raisonnement
Recommandation forte	Recommandation pour ou contre un test moléculaire particulier pour le cancer colorectal (peut inclure « doit » ou « devrait »).	Preuves convaincantes ou adéquates de haute qualité ou de qualité intermédiaire avec des bénéfices clairs écartant tout inconvénient.
Recommandation	Recommandation pour ou contre la pratique d'un test moléculaire particulier du cancer colorectal (peut inclure « devrait » ou « pourrait »).	Quelques limites de la force des preuves (adéquate ou inadéquate) et de la qualité des preuves (intermédiaire ou faible), équilibre entre les bénéfices et les inconvénients, les valeurs ou coûts, le groupe d'experts conclut néanmoins qu'il existe assez de preuves ou de bénéfices pour émettre une recommandation.
Opinion du consensus d'experts	Recommandation pour ou contre la pratique d'un test moléculaire particulier du cancer colorectal (peut inclure « devrait » ou « pourrait »).	Limites importantes dans la force des preuves (inadéquat ou insuffisant), qualité des preuves (intermédiaire ou faible), l'équilibre des bénéfices et des inconvénients, les valeurs, ou coûts, le consensus d'experts trouvent néanmoins nécessaire de produire une déclaration.
Pas de recommandation	Pas de recommandation pour ou contre un test moléculaire particulier pour le cancer colorectal.	Preuve ou entente insuffisante sur l'équilibre entre les bénéfices, les inconvénients, les valeurs ou coûts pour pouvoir émettre une recommandation.

Source : Tableau adapté de Sepulveda *et al.*, 2017.

L'ASCP, le CAP, l'AMP et l'ASCO s'accordent pour publier les recommandations suivantes :

- L'analyse du statut mutationnel des gènes *RAS*, notamment les codons 12 et 13 de l'exon 2; 59 et 61 de l'exon 3 et 117 et 146 de l'exon 4 (recommandation).
- L'utilisation d'une méthode de détection des marqueurs du cancer colorectal qui permettrait la détection de mutations dans des échantillons avec moins de 5 % de fréquence d'allèle muté, en tenant compte de la sensibilité technique et de l'enrichissement de cellules tumorales (opinion du consensus d'experts).
- L'accessibilité la plus rapide possible des résultats de détection de marqueurs moléculaires du cancer colorectal afin d'effectuer la décision thérapeutique. Il est à noter que 90 % des rapports doivent être produits par les laboratoires dans les 10 jours ouvrables à compter de la date de réception des échantillons (opinion du consensus d'experts) [Sepulveda *et al.*, 2017].

Alberta Health Services

L'équipe provinciale de tumeurs gastrointestinale recommande de rechercher des mutations activatrices des gènes *RAS* (*KRAS* et *NRAS*) dans les tissus tumoraux des patients atteints de cancer colorectal métastatique lorsqu'un diagnostic de stade IV est posé. Elle soutient également l'utilisation d'inhibiteurs EGFR dans les traitements de première intention des patients atteints de cancer colorectal métastatique et porteurs de gènes *RAS* non mutés [AHS, 2018].

Japanese Society of Medical Oncology

La société japonaise d'oncologie médicale recommande fortement l'analyse des mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* avant l'instauration d'un traitement anti-EGFR chez les patients atteints de cancer colorectal non résécable, avancé ou récurrent. Elle recommande également la réalisation de tests génétiques pour le traitement du cancer colorectal, dans des laboratoires dont la conformité aux exigences en matière de contrôle de la qualité est démontrée [Yamazaki *et al.*, 2018].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Détection de mutations du gène *NRAS* par TAAN

La recommandation de l'INESSS

Considérant qu'il s'agit d'une demande de désignation complémentaire pour une analyse déjà au *Répertoire*, les données de validation analytique ont été jugées :

- ☐ Complètes
- ☒ Incomplètes

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité clinique de l'analyse est reconnue.
- ✓ Quelques éléments sont requis pour compléter la validation :
 - données de reproductibilité dans le temps (intra- inter-essais);
 - présenter les biais, les données de recouvrement, de sensibilité, et de spécificité;
 - effectuer l'analyse avec des spécimens positifs;
 - utiliser si possible du matériel certifié ou provenant d'un programme externe.
- ✓ L'INESSS recommande au laboratoire demandeur de mettre en place un mécanisme de contrôle de qualité externe (échanges d'échantillons avec d'autres laboratoires désignés pour cette analyse).

RÉFÉRENCES

- Alberta Health Services (AHS). Metastatic colorectal cancer. Clinical Practice Guideline GI-003. Edmonton, AB : AHS; 2018. Disponible à : <https://www.albertahealthservices.ca/assets/info/hp/cancer/if-hp-cancer-guide-gi003-colorectal-metastatic.pdf>.
- Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, Schilsky RL. Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion update 2015. *J Clin Oncol* 2016;34(2):179-85.
- Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: Testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 2009;27(12):2091-6.
- Benson AB 3rd, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 2018;16(4):359-69.
- Benson AB 3rd, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, et al. Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15(3):370-98.
- BlueCross BlueShield (BCBS) of Louisiana. KRAS, NRAS and BRAF mutation analysis in metastatic colorectal cancer. Baton Rouge, LA : BCBS; 2017. Disponible à : <https://pdfs.semanticscholar.org/b729/0431f7f073fc41dc3d8c07d4046a0a299b19.pdf>.
- Bristol-Myers Squibb Canada. Erbitux^{MC} en association avec la chimiothérapie maintenant approuvé au Canada comme traitement de première intention chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique [communiqué de presse]. Montréal, Qc : Bristol-Myers Squibb Canada; 2013. Disponible à : <https://www.newswire.ca/fr/news-releases/erbituxmc-en-association-avec-la-chimiotherapie-maintenant-approuve-au-canada-comme-traitement-de-premiere-intention-chez-les-patients-atteints-de-cancer-colorectal-metastatique-511828901.html>.
- De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010;11(8):753-62.
- Dienstmann R et Tabernero J. Spectrum of gene mutations in colorectal cancer: Implications for treatment. *Cancer J* 2016;22(3):149-55.

- Hawkes E et Cunningham D. Relationship between colorectal cancer biomarkers and response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2010;28(28):e529-31; author reply e532-3.
- Hsu H-C, Thiam TK, Lu Y-J, Yeh CY, Tsai W-S, You JF, et al. Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2016;7(16):22257-70.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Avis au Ministre de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux pour la mise à jour des listes des médicaments (Erbix^{MC} p. 225-8 et Vectibix^{MC} p. 263-7). Québec, Qc : INESSS; 2018a. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Fevrier_2018/AvisMinistre_Web_2018_02.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Analyse combinée des gènes KRAS-NRAS-BRAF par séquençage de nouvelle génération pour le traitement du cancer colorectal métastatique. Québec, Qc : INESSS; 2018b. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Mars_2018/INESSS_Avis_Analyse-combinee-genes-KRAS-NRAS-BRAF.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Recherche de mutations ciblées dans les exons 2, 3 et 4 du gène NRAS dans les tumeurs colorectales méastastatiques. Québec, Qc : INESSS; 2016. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Juin_2016/INESSS-Avis_analyses_bm-juin16_1_mutations_exons2_3_4_genes_NRAS_tumeurs_colorectales_meastastatiques.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS) et Groupe d'étude en oncologie du Québec (GÉOQ). Algorithmes d'investigation de traitement et de suivi – Cancer du côlon (mise à jour). Québec, Qc : INESSS et GÉOQ; 2016. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Rapports/Oncologie/INESSS_Algorithme_traitement_cancer_colon.pdf.
- Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141(5):625-57.
- Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques canadiennes sur le cancer. Sujet particulier : Le cancer du pancréas. Toronto, ON : SCC; 2017. Disponible à : <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2017-FR.pdf>.

Yamazaki K, Taniguchi H, Yoshino T, Akagi K, Ishida H, Ebi H, et al. Japanese Society of Medical Oncology clinical guidelines: Molecular testing for colorectal cancer treatment, third edition. *Cancer Sci* 2018;109(6):2074-9.

SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION DES GÈNES *F8* et *VWF* (RÉFÉRENCE – 2018.03.008)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Tous les membres du comité présent à la rencontre ont participé aux délibérations et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation de même que l'exactitude du contenu en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, les experts consultés sont :

- D^{re} Margaret Warner, hématologue au Centre universitaire de Santé McGill;
- D^r Régen Drouin, généticien au CHU de Québec – Université Laval.

2. RÉSUMÉ

	Séquençage de nouvelle génération de gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i>
Demandeur	CHU Sainte-Justine.
Nom et objectif de l'analyse	- Diagnostic moléculaire de : - l'hémophilie A (HA); - la Maladie de von Willebrand (MvW). - Déterminer le risque de développer des inhibiteurs chez les patients atteints d'HA légère à modérée (L/M).
Situation actuelle	Actuellement, les analyses de première ligne pour le diagnostic d'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand sont des tests phénotypiques. Les analyses moléculaires figurant dans le <i>Répertoire</i> sont : - Inversion des introns 1 et 22 du gène <i>F8</i> pour les HA grave; - Aucune analyse moléculaire pour le diagnostic d'HA L/M et de la MvW types 1 et 3; - Séquençage des exons 18 à 21 et 28 à 31 du gène <i>VWF</i> pour la MvW type 2. Les cas jugés urgents sont envoyés pour une analyse moléculaire à l'extérieur du Québec.
Nombre d'analyses prévues	Le demandeur prévoit 150 analyses par an.
Avantages allégués par le demandeur	- Le SNG est l'outil idéal pour établir un diagnostic précis des différentes formes d'HA et de MvW qui peuvent être présentes simultanément chez un même sujet. - Les patients HA L/M à risque de développer des inhibiteurs recevraient des traitements alternatifs aux concentrés de facteurs VIII. - Un SNG des 2 gènes représente une économie de temps et d'argent en réduisant le nombre de consultations médicales avec investigations cliniques en séquences. - L'analyse permettrait d'offrir un diagnostic moléculaire à l'ensemble des patients atteints par ces 2 maladies.
Valeur diagnostique	- Le génotypage des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i> par SNG permet de poser ou de préciser le diagnostic d'HA et de MvW chez 99 % des patients. - Le SNG du gène <i>VWF</i> permet de corriger un diagnostic erroné dans environ 27 % des patients.
Valeur thérapeutique	Certaines mutations du gène <i>F8</i> sont associées à un risque de développer des inhibiteurs suivant une exposition à des concentrés de FVIII (0 % à 42 %). L'utilisation du SNG chez des patients atteints d'HA L/M permet d'estimer ce risque sur une base individuelle et de proposer des thérapies alternatives.

Données de validation locales	• Le SNG a présenté une profondeur de lecture moyenne de 200x et 99 % de la séquence est couverte à au moins 30x. • La qualité de lecture Q30 est supérieure à 90 %. • Le SNG a été validé avec 14 échantillons présentant des mutations du gène <i>F8</i>, du gène <i>VWF</i> ou des 2 gènes.
Impact budgétaire	La valeur pondérée de l'analyse a été fixée à 576,51 par le demandeur. Considérant que le financement par le National Program for Hemophilia Mutation Testing prendra fin sous peu, l'ajout de l'analyse par SNG des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i> au <i>Répertoire</i> pourrait engendrer une réduction de coûts d'environ 141 000 \$ pour le total des trois premières années.
Positions et orientations d'organisme d'intérêts	Le Nordic Hemophilia Council et la United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation (UKHCDO) recommandent que le génotypage du gène <i>F8</i> soit réalisé chez les patients atteints d'HA grave qui ne présentent pas d'inversion des introns 1 et 22 et chez ceux atteints d'HA L/M. La UKHCDO recommande que les analyses génétiques soient utilisées si bénéfiques pour clarifier le diagnostic de la MvW ou aider à la prise en charge des patients. La Canadian Hemophilia Society et l'American Society of Hematology proposent des algorithmes diagnostiques dans lesquels figurent des analyses génétiques pour la MvW.
Enjeux particuliers	• La disponibilité du séquençage <i>F8</i> et <i>VWF</i> sans frais hors Québec prendra possiblement fin prochainement selon le demandeur. • Un volume d'analyse supplémentaire est à prévoir en raison de l'analyse rétrospective de patients qui n'ont pas encore de confirmation moléculaire. • Le SNG tel que proposé ne permet pas de détecter des duplications ou de grandes délétions.

3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* pour diagnostiquer l'hémophilie A et la maladie de von Willebrand. L'analyse vise également à déterminer la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'hémophilie A modérée à légère selon leur risque de développer des inhibiteurs.

3.2. Description de la méthode

Le séquençage de nouvelle génération (SNG) désigne les différents systèmes qui permettent le séquençage de plusieurs gènes simultanément. Cette technologie est caractérisée par un rendement de lecture très élevé en comparaison de la méthode classique, soit le séquençage de Sanger.

Concernant la présente demande, le système MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC} sera utilisé pour détecter des mutations germinales présentes dans la région promotrice, les exons, les sites d'épissage et les régions introniques des gènes *F8* (Facteur VIII) et *VWF* (Facteur von Willebrand [FvW]) à l'exception de séquences répétées (tableau 1). Les régions codantes des gènes *F8* et *VWF* sont couvertes à 100 % à l'exception des exons 15 et 26 du gène *VWF* qui présentent un défaut de couverture et qui seront séquencés par Sanger.

Le SNG est réalisé en trois étapes principales, soit la préparation de l'ADN génomique et de la librairie d'ADN fragmenté, le séquençage et l'analyse des variants. L'ADN génomique des patients est fragmenté par sonicateur Covaris^{MC} puis une librairie est préparée à partir des fragments générés. La capture des régions d'intérêt et l'amplification des librairies sont réalisées à l'aide de la trousse SureSelect XT^{MC}. Les librairies sont ensuite séquencées sur une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC} par la synthèse cyclique d'un brin complémentaire à la matrice en utilisant des nucléotides fluorescents. Contrairement au séquençage classique, le SNG réalise des millions de réactions simultanément. Les séquences obtenues sont ensuite assemblées et alignées à une séquence de référence.

L'analyse des variants est réalisée à l'aide d'outils de prédiction de la protéine (Polyphen, Sift, Mutation Tester). La fréquence du variant dans les bases de données publiques (1000G, GnomAD) permet d'éliminer les variants communs dans la population. Des bases de données plus spécifiques comme les EAHAD coagulation factor variant databases permettent également de sélectionner les variants d'intérêt.

Seule la séquence codante sera analysée. En absence de mutations dans la séquence codante la séquence non codante pourra être analysée afin de détecter des variations pathogéniques déjà documentées. Les variants pathogéniques relevés seront validés par séquençage de Sanger.

Tableau 1 Couverture des gènes *F8* et *VWF* par séquençage de nouvelle génération

GÈNES	POSITION GÉNOMIQUE	SÉQUENCE TOTALE	TAILLE DE LA CIBLE	COUVERTURE	NB DE SONDES
<i>F8</i>	chrX : 5'UTR : 154255269 3'UTR : 154059877	195 392	383 457	323 489	3 292
<i>VWF</i>	Chr12 : 5'UTR : 6245051 3'UTR : 6056921	188 065			

Abréviations : Chr : Chromosome; Pb : Paires de bases; UTR : Régions non traduites, de l'anglais *untranslated regions*.

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

L'échantillon sanguin est acheminé au laboratoire de diagnostic moléculaire du CHU Sainte-Justine pour extraction de l'ADN génomique. L'ADN est conservé à 4 °C. Les bibliothèques sont préparées, multiplexées puis séquencées sur place. Les analyses bio-informatiques sont réalisées par un professionnel spécialisé en biologie moléculaire pour l'identification de variations génétiques significatives et la validation de celles-ci par séquençage de type Sanger.

3.4. Société ou concepteur

Trousse SureSelect XT^{MC} d'Agilent^{MC}.

Plateforme de séquençage MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}.

3.5. Homologation

Cette analyse n'a fait l'objet d'aucune homologation par Santé Canada ou la Food and Drug Administration (FDA).

3.6. Valeur pondérée : 576,51

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Sujets avec manifestations cliniques de tendance hémorragique chez qui une histoire personnelle et familiale, de même que des tests fonctionnels permettent de suspecter une hémophilie A ou une des multiples formes de maladie de von Willebrand.

4.2. Description de la maladie visée

L'hémophilie A est une maladie génétique récessive liée au chromosome X caractérisée par un déficit congénital en facteur VIII de coagulation. Sa prévalence est de moins d'une personne sur 10 000 [SCH, 2018] soit 3 110 Canadiens en 2016 [WFH, 2016]. Il s'agit de l'hémophilie dite classique puisqu'elle constitue la forme la plus commune de déficit en facteurs de coagulation. Ce déficit se traduit par un temps de coagulation prolongé menant à de fréquents épisodes de saignements aux articulations (hémarthroses) et aux tissus mous [Duan *et al.*, 2014]. Le déficit en facteur VIII est qualifié de grave, modéré ou léger lorsque la concentration

plasmatique mesurée est respectivement : inférieure à 1 %, entre 1 et 5 % et entre 5 et 40 %, et ce, comparativement aux personnes sans trouble de la coagulation. La prise en charge des patients atteints d'hémophilie A grave inclut le traitement épisodique et la prophylaxie au moyen de facteur VIII de remplacement [Srivastava *et al.*, 2013].

La demi-vie du facteur VIII est d'une heure comparativement à 12 heures lorsqu'il est lié au facteur von Willebrand (FvW) [Pipe *et al.*, 2016; Oldenburg et Albert, 2014]. Pour cette raison, un déficit en FvW peut mimer une hémophilie A. Ce déficit est nommé maladie de von Willebrand et est présent chez 4 180 canadiens [WFH, 2016].

La maladie de von Willebrand est divisée en plusieurs sous-types selon les anomalies du FvW. Les maladies de von Willebrand de types 1 et 3 sont respectivement causées par un déficit quantitatif partiel et par un déficit complet du FvW alors que la maladie de von Willebrand de type 2 est causée par un déficit fonctionnel du FvW (annexe A) [Favaloro, 2017].

La prise en charge des patients atteints de la maladie de von Willebrand inclut le traitement avec des concentrés de FVIII/FvW dérivés du plasma, la desmopressine et l'acide tranexamique (annexe B).

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur prévoit un minimum de 150 analyses par an pour les 3 prochaines années, soit 125 analyses pour la maladie de von Willebrand et 25 analyses pour l'hémophilie A.

4.4. Situation actuelle

Actuellement, les analyses de première ligne pour le diagnostic d'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand sont des tests phénotypiques.

Une analyse par TAAN qui permet de détecter l'inversion de l'intron 22 et de l'intron 1 du gène *F8* (code 25026) est réalisée chez les patients qui présentent des symptômes d'hémophilie A grave. Les patients négatifs à cette analyse et ceux dont les tests phénotypiques pointent vers une hémophilie A modérée à légère sont prévus être testés par séquençage Sanger à l'extérieur du Québec. Ceux suspectés d'une maladie de von Willebrand de type 2N, 2A, 2B et 2M sont testés par un séquençage Sanger partiel du gène *VWF* qui couvre les exons 18 à 21 et 28 à 31 (code 25070). Ceux dont le phénotype suggère une maladie de von Willebrand de type 1 ou 3, ne bénéficient pas de test moléculaire permettant de confirmer leur diagnostic.

Selon le demandeur, les échantillons des cas plus urgents et dont le séquençage partiel du gène *VWF* est négatif sont acheminés à Kingston pour réaliser le séquençage Sanger de toutes les régions codantes du gène *VWF*. Les autres échantillons négatifs sont conservés en attendant que l'analyse proposée soit introduite au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* (ci-après nommé *Répertoire*). Les analyses réalisées à Kingston sont actuellement défrayées par un financement du National Program for Hemophilia Mutation Testing. Le demandeur indique que ce financement est limité et prendra fin prochainement.

Le demandeur propose de remplacer le séquençage partiel du gène *VWF* par le SNG des gènes *F8* et *VWF* et il ne serait plus nécessaire de réaliser des séquençages hors Québec pour le diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand. Tous les patients dont les tests phénotypiques permettent de suspecter une hémophilie A ou une maladie de von Willebrand bénéficieraient d'une analyse complète de toutes les séquences codantes des gènes *F8* et *VWF* (annexe C).

4.5. Données médico administratives

D'après les données d'envois hors Québec du ministère de la Santé et des Services sociaux pour la période 2016-17, le séquençage du gène *VWF* a été facturé à l'extérieur du réseau à 3 reprises au coût total de 11 154 \$ alors que celui du gène *F8* a été facturé à 6 reprises au coût total de 4 308 \$. Actuellement les analyses acheminées à Kingston ne sont pas comptabilisées. Le demandeur indique que 3 séquençages ont été réalisés à Kingston au cours de la dernière année à la suite d'une analyse négative du gène *VWF*.

Les analyses impliquées dans le diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand figurant au *Répertoire* ainsi que les volumes d'activités sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 Données médico administratives des analyses liées au diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand en 2017-2018

CODE	ANALYSE	VP	VOLUME D'ANALYSES	COÛT (\$)
Facteur VIII				
20080	Facteur de coagulation (II, V, VII, VIII, IX, X, XI et XII) (activité)	6	21 078	126 468
20122	Facteur VIII (détermination de la concentration) (méthode chromogène)*	23	-	-
20143	Anti-facteur VIII (détection) (ELISA)	7,8	275	2 145
25026	Hémophilie A Facteur VIII; inversion intron 22 (IVS22 inv) (TAAN)	242	25	6 050
25022	Facteur VIII haplotype (hémophilie A) (TAAN)	231	2	462
25028	Hémophilie A ou B (diagnostic de porteuses et prénatal, mutation connue) (séquençage)	160	83	13 612
Facteur Von Willebrand				
20088	Facteur von Willebrand (activité) (ELISA)	12,3	2 090	25 707
20089	Facteur von Willebrand (antigène)	6	4 654	27 924
20090	Facteur von Willebrand (multimères du)	77	758	58 366
20249	Test de liaison du FVW au collagène	12,9	9	116
20250	Test de liaison du FVIII au FVW	10,4	1†	10
20009	Anti Facteur von Willebrand (anti-FVW)	12,7	-†	-
25070	Von Willebrand type 2 (2A, 2B, 2M, 2N); VWF (exons 18 à 21 et 28 à 31) mutations associées (séquençage)	227	131	29 737

Abréviations : VP : Valeur pondérée.

* Analyse ajoutée au *Répertoire* en 2018-2019.

† Aucune analyse réalisée au cours des années administratives 2014-2105, 2015-2016, 2016-2017.

4.6. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, le SNG est l'outil technique idéal pour établir un diagnostic précis et fiable de plusieurs formes d'hémophilie A et de maladies de von Willebrand qui peuvent être présentes simultanément chez un même sujet, ce qui est à peu près impossible à déterminer de façon certaine par les méthodes d'études fonctionnelles conventionnelles.

Pour les sujets avec Hémophilie A légère, dont les mutations sont associées à un haut risque de développer des inhibiteurs, on évitera les concentrés de FVIII et on remplacera par des traitements non spécifiques comme la desmopressine, l'acide tranexamique et le Facteur VII recombinant activé. Pour les sujets avec maladie de von Willebrand de type 2N, on évitera les concentrés de FVIII recombinant qu'on remplacera par du concentré de FVIII dérivé du plasma et renfermant du FvW.

Un séquençage combiné par SNG de *F8* et *VWF* représente une économie de temps et d'argent en éliminant les multiples consultations médicales avec investigations cliniques et biologiques séquentiellement, pour éventuellement conduire de toute façon à des séquençages Sanger séparés dans le temps.

Cette analyse permettrait d'offrir un diagnostic moléculaire complet de la maladie de von Willebrand puisqu'à ce jour l'analyse d'une infime portion du gène est offerte. La technologie de séquençage de nouvelle génération permet d'offrir une analyse complète et de diagnostiquer des individus qui ne pouvaient pas l'être auparavant.

4.7. Assurance qualité

Le demandeur a des ententes ratifiées de partages biannuels d'échantillons présentant des mutations des gènes *F8* et *VWF* avec le département de pathologie et de médecine moléculaire de la Queen's University à Kingston en Ontario et avec le laboratoire d'hémostase du CHU de Lille en France.

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Valeur diagnostique

Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* en parallèle

La recherche documentaire a permis de repérer 2 études dans lesquelles le diagnostic d'hémophilie A ou de maladie de von Willebrand, établi au moyen de tests phénotypiques, a été confirmé par le séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* [Bastida *et al.*, 2017; Bastida *et al.*, 2016]. Le détail des études est présenté à l'annexe D.

La première étude [Bastida *et al.*, 2017] avait pour objectif d'évaluer l'utilité d'un algorithme de diagnostic moléculaire incluant le SNG chez des patients atteints d'hémophilie A et d'hémophilie B. L'algorithme proposé est le suivant : 1) détection des inversions dans l'intron 22 et ensuite dans l'intron 1 du gène *F8* chez les patients atteints d'hémophilie A grave; 2) SNG des gènes *F8*, *F9* et *VWF* chez les patients sans inversions détectées et chez les patients atteints d'hémophilie A non grave et atteints d'hémophilie B; 3) amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligature (MLPA de l'anglais, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) du gène *F8* chez les patients sans variant pathogène détecté par les autres analyses. Les échantillons provenant de 102 patients ont été analysés.

L'inversion dans l'intron 22 du gène *F8* a été détectée chez 11 patients atteints d'hémophilie A grave et chez 1 femme porteuse obligatoire. L'inversion dans l'intron 1 n'a été décelée chez aucun patient. Par la suite, le SNG a permis de détecter des mutations pathogéniques des gènes *F8* et *VWF* chez 8 des 9 patients atteints d'un déficit grave en FVIII sans inversion, chez 57 des 58 patients atteints d'un déficit léger à modéré en FVIII et chez 4 femmes porteuses obligatoires ou symptomatiques.

Les auteurs ont conclu que l'utilisation de l'algorithme moléculaire proposé a permis de détecter les mutations responsables de la maladie chez 99 % des patients avec une concentration faible de FVIII et de FIX et d'assigner un diagnostic de maladie de von Willebrand pour certains patients (tableau 3).

La 2^e étude [Bastida *et al.*, 2016] a été réalisée avec un panel de 23 gènes⁷ analysés par SNG. Parmi les 20 patients testés, un diagnostic phénotypique d'hémophilie A et de maladie de von Willebrand avaient respectivement été posés chez 8 patients et 2 patients. Le SNG a permis de valider le diagnostic d'hémophilie A de 7 patients et de maladie de von Willebrand des 2 patients par la détection de mutations pathogéniques connues ou déterminées pathogéniques par différents outils bio-informatiques⁸. L'autre patiente suspectée d'être porteuse symptomatique d'une mutation du gène *F8* en raison d'une activité réduite du facteur VIII (40 %), ne présentait aucune mutation de ce gène. Le SNG a par ailleurs permis de déceler une mutation faux sens homozygote située dans le 20^e exon du gène *VWF*, qui correspond au domaine de liaison avec le FVIII. Cette mutation avait déjà été documentée comme étant associée à la maladie de von Willebrand de type 2N [Mazurier *et al.*, 2001].

Les auteurs ont conclu que cette approche peut être précise, reproductible et représenter un outil fiable pour établir le diagnostic génétique des désordres héréditaires de la coagulation sanguine.

⁷ Les gènes séquencés dans le panel sont : *F2, F5, F7, F8, F9, F10, F11, F13A1, F13B, FGA, FGB, FGG, FIBCD1, GGCX, LMAN1, MCFD2, PLAT, PLAUR, PLG, PLGRKT, TFPI, VKORC1* et *VWF*.

⁸ Afin de déterminer l'impact sur la structure, la fonction et la pathogénicité des nouveaux variants, les outils Poly-Phen2, SIFT, SNPs&GO, SNAP et HANSA ont été consultés par les auteurs.

Tableau 3 Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* pour le diagnostic de l'hémophilie A et des maladies de von Willebrand

ÉTUDES	DIAGNOSTIC		DIAGNOSTICS CORRIGÉS
	PHÉNOTYPIQUE	FINAL	
Bastida <i>et al.</i> , 2017	HA graves : 20	HA graves : 20*	Aucun
	HA M/L : 58	HA M/L : 52† MvW : 6 (types 1 et 2N)	6
	Porteuses obligatoires de HA : 5	Porteuses de HA : 3‡ MvW : 2 (type 2N)	2
Bastida <i>et al.</i> , 2016	HA : 8	HA : 7 MvW : 1 (type 2N)	1
	MvW : 2	MvW : 2	Aucun

Abréviations : HA : Hémophilie A; M/L : Modérée à légère; MvW : Maladie de von Willebrand.

* 11 confirmés par la présence d'une inversion de l'intron 22 et n'ont pas été testés par SNG, 8 confirmés par le SNG et une délétion décelée par MLPA.

† 51 avec des mutations détectées par SNG (47 dans la séquence codante et 4 dans les introns) et 1 sans mutation détectable par aucune des méthodes.

‡ 1 avec inversion de l'intron 22, et 2 avec mutations détectées par SNG.

Séquençage de nouvelle génération du gène *VWF*

La recherche documentaire a permis de repérer 3 études dans lesquelles des patients ont reçu un diagnostic de maladie de von Willebrand au moyen de tests phénotypiques et dont le gène *VWF* a été analysé par SNG sur une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC} [Borràs *et al.*, 2017; Fidalgo *et al.*, 2016; Boylan *et al.*, 2015]. Les caractéristiques ainsi que les principaux résultats des études présentées dans cette section sont résumés à l'annexe E.

Borràs et ses collaborateurs [2017] ont réalisé une étude prospective dans laquelle ils présentent, entre autre, les résultats d'une analyse de corrélation génotype-phénotype chez 556 individus dont 442 qui ont reçu un diagnostic phénotypique de maladie de von Willebrand.

Les 52 exons, les sites d'épissages et la région promotrice du gène *VWF* ont été analysés par SNG avec une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}. Les mutations détectées ont été validées par séquençage Sanger ainsi que les régions faiblement couvertes.

Globalement, l'analyse mutationnelle des 556 patients a permis de reclasser le sous-type de maladie de von Willebrand de 105 patients, d'en exclure 5 et d'établir un diagnostic de maladie de von Willebrand chez 43 cas qui avaient été exclus (tableau 4).

Tableau 4 Répercussions du SNG sur le diagnostic final des patients référés pour la maladie de von Willebrand

DIAGNOSTIC (556 PATIENTS)		DIAGNOSTICS CORRIGÉS
PHÉNOTYPIQUE	FINAL	
Type 1 : 126	Type 1 : 113 13 reclassés : type 1H, porteur type 3, type 2M, type 2B	13
Type 1H : 22	Type 1H : 14 8 reclassés : type 1, porteur type 3, incertain	8
Type 3 : 44	Type 3 : 41 3 reclassés : non MVW	3
Porteurs type 3 : 5	Porteurs type 3 : 0 6 reclassés : type 1, type 1H	6 [†]
Type 2A : 59	Type 2A : 57 2 reclassés : non MVW, type 2B	2
Type 2A/2M : 38	Type 2A/2M : 31 7 reclassés : type 1, type 2A	7
Type 2B : 23	Type 2B : 21 2 reclassés : type 2A	2
Type 2M : 32	Type 2M : 31 1 reclassé : type2A	1
Type 2N : 9	Type 2N : 9 Aucun changement	Aucun
Porteurs type 2N : 10	Porteurs type 2N : 10 Aucun changement	Aucun
Type Incertain : 74	Type Incertain : 6 68 reclassés : type 1, type 3, porteur type 3, type 2A, type 2A/2M, type 2B, type 2M, non MVW)	68
Non-MvW : 114	Non MvW : 71 43 reclassés (type 1, type 1H, porteur type 3, type 2A, type 2M, porteur type 2N)	43

Adaptée de Borràs *et al.*, 2017.

Abréviations : MvW : Maladie de von Willebrand; N : Nombre; SNG : Séquençage de nouvelle génération.

* Les anomalies génétiques ont été détectées par SNG, à l'exception de 2 délétions détectées par MLPA.

Les auteurs ont conclu que le SNG du gène *VWF* permet de corriger un diagnostic erroné dans 27 % des patients. Par ailleurs, les auteurs affirment que le SNG pourrait être utilisé comme test diagnostique de routine de première ligne pour cette catégorie de patients.

L'étude réalisée par Fidalgo et ses collaborateurs [2016] avait pour buts de parfaire la compréhension de la corrélation génotype-phénotype des différents types de maladie de von Willebrand et de comparer les résultats obtenus par le séquençage Sanger et par SNG.

Le diagnostic de 92 patients a été déterminé par les tests phénotypiques. Les anomalies génétiques engendrant les différents types de maladie de von Willebrand ont été détectées par séquençage Sanger et par SNG au moyen d'une plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}.

Le SNG a permis de confirmer toutes les mutations décelées par séquençage Sanger et de détecter 26 mutations supplémentaires, soit 6 mutations faux-sens, 6 mutations synonymes et 17 mutations introniques. Les analyses génétiques ont permis de corriger le diagnostic phénotypique de 4 patients (tableau 5).

Tableau 5 Corrélation génotype-phénotype des patients atteints de la maladie de von Willebrand

DIAGNOSTIC FINAL		INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES RÉVÉLÉES PAR LES ANALYSES MOLÉCULAIRES
TYPE DE MVW	NOMBRE DE PATIENTS	
1	7	1 porteur htz d'une mutation associée à MVW type 3. 1 htz composé dont la mère présente un phénotype type 2M.
3	15	1 patient htz composé dont 1 parent présente un phénotype type 1 et l'autre est asymptomatique. 1 hmz pour 1 mutation dont la contribution à un phénotype sévère reste à démontrer.
2B	6	1 diagnostic de syndrome de Bernard-Soulier écarté. 1 diagnostic de MVW corrigé pour MVW-LP par le séquençage de <i>GP1BA</i> .
2N	12	1 htz composé dont les mutations étaient associées au type 2N et au type 3. 2 avaient auparavant reçu un diagnostic erroné d'HA légère.
2A	9	8 avec des mutations concordantes 1 avec une mutation <i>VWF</i> non informative (p.Cys1130Arg)
2M	11	1 patient htz composé dont la mère a un phénotype type 1

Source : Fidalgo *et al.*, 2016.

Abréviations : Ex. : Exon; HA : Hémophilie A; Hmz : Homozygote; Htz : Hétérozygote; MVW : Maladie de von Willebrand; MvW-LP : MvW liée aux plaquettes; Phéno. : Phénotype; Tx : Traitement.

Les auteurs ont conclu que le SNG est une excellente technologie qui permet un diagnostic plus rapide et suggèrent l'utilisation du SNG lorsque l'activité du FvW est inférieure à 30 % ou lorsque le ratio FVIII : FvW est inférieur à 0,5. De plus, cette approche leur a permis de distinguer des phénotypes similaires tels que la maladie de von Willebrand de type 2N de l'hémophilie A légère, la maladie de von Willebrand de type 2B du syndrome de Bernard-Soulier et la maladie de von Willebrand liée aux plaquettes de la maladie de von Willebrand de type 2B.

Boylan et ses collaborateurs [2015] ont réalisé une étude qui avait pour but d'investiguer la présence de saignements inexpliqués chez 37 patients atteints d'hémophilie A sans mutation connue du gène *F8*, en évaluant la concentration plasmatique du FvW et sa capacité à se lier au FVIII ainsi que le génotype *VWF*. Un groupe de 65 témoins atteints d'hémophilie A non grave avec mutations connues du gène *F8* a également été testé.

Les analyses phénotypiques ont été réalisées et chaque exon plus ou moins 20 paires de bases ont été analysés sur la plateforme MiSeq^{MC} d'Illumina^{MC}. Les variants détectés ont été validés par séquençage de Sanger.

Le SNG a permis de valider un diagnostic de maladie de von Willebrand de type 3 pour 4 patients sans mutation connue du gène *F8* et de reconnaître un patient atteint de maladie de von Willebrand de type 1 parmi les patients du groupe témoin. De plus, des mutations dans le gène *VWF* et possiblement contributives au phénotype de tendance hémorragique ont été détectées chez 6 patients et chez 5 témoins (tableau 6).

Tableau 6 Séquençage de nouvelle génération du gène *VWF* pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand

PATIENTS RECRUTÉS (N)	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	RÉSULTATS DES ANALYSES MOLÉCULAIRES
HA sans mutation <i>F8</i> connue : 37	MvW type 3 suspectée : 4	MvW type 3 : 4
	MvW suspectée : 8	HA sans mutation <i>F8</i> porteurs d'une mutation du gène <i>VWF</i> pouvant contribuer à un phénotype de saignement : 3
	MvW non suspectée : 25	HA sans mutation <i>F8</i> porteurs d'une mutation du gène <i>VWF</i> pouvant contribuer à un phénotype de saignement : 3
HA non grave avec mutation <i>F8</i> : 65 (témoins)	MvW type 1 ou 2 suspectée : 1	MvW type : 1
	MvW suspectée : 6	Mutation du gène <i>VWF</i> : 0
	MvW non suspectée : 58	HA avec mutation <i>F8</i> et mutation <i>VWF</i> pouvant contribuer au phénotype de saignement : 5

Adapté de Boylan *et al.*, 2015.

Abréviations : HA : Hémophilie A; MvW : Maladie de von Willebrand; N : Nombre.

Les auteurs ont conclu que l'ajout des analyses phénotypiques du FvW et génotypiques à l'analyse du gène *F8* chez les patients qui ont reçu un diagnostic d'hémophilie A permettrait de détecter certains cas d'erreur diagnostique.

5.2. Valeur pronostique

Aucune étude n'a été retenue puisque l'analyse proposée par le centre demandeur n'a pas pour objectif de prévoir l'évolution de la maladie ou d'anticiper un changement futur de l'état de santé.

5.3. Valeur thérapeutique

La recherche documentaire a permis de repérer une étude évaluant le risque des patients atteints d'hémophilie A non grave de développer des inhibiteurs selon leur génotype *F8*, en tenant compte de l'exposition cumulative des concentrés de FVIII [Eckhardt *et al.*, 2013]. Cette étude est détaillée dans l'annexe F.

L'étude a été réalisée sur 895 patients atteints d'hémophilie A non grave et dont le génotype du gène *F8* était connu. Parmi ces patients traités avec des concentrés de FVIII à au moins une reprise, 51 ont développé des inhibiteurs du FVIII (5,7 %).

Parmi les patients ayant développé des inhibiteurs, 19 mutations différentes ont été détectées, toutes des mutations faux-sens localisées dans le domaine A2 de la chaîne lourde et dans les domaines A3, C1 et C2 de la chaîne légère du FVIII. Ces mutations ont également été décelées chez 282 patients sans inhibiteur, pour un total de 333 patients.

Pour l'ensemble des patients, le risque de développer des inhibiteurs à 20 jours, 50 jours et 100 jours d'exposition aux concentrés de FVIII était de 3,5 % (IC95 % : 2,1 à 4,9), 6,7 % (IC95 % : 4,5 à 8,9) et 13,3 % (IC95 % : 9,6 à 17,0) respectivement. Le risque a été calculé à 20 jours et à 50 jours d'exposition pour chaque mutation présente chez au moins 10 patients (tableau 7).

Tableau 7 Risque de développer des inhibiteurs selon le génotype *F8* des patients atteints d'hémophilie A non grave.

MUTATIONS <i>F8</i> ASSOCIÉES AU DÉVELOPPEMENT D'INHIBITEURS	NOMBRE DE PATIENTS	NOMBRE DE PATIENTS AVEC INHIBITEURS (%)	RISQUE DE DÉVELOPPER DES INHIBITEURS % (IC95 %)*	
			20 JOURS D'EXPOSITION	50 JOURS D'EXPOSITION
Arg531Cys	35	1 (2,9)	s. o.	s. o.
Arg593Cys	106	12 (11,3)	9,1 (2 à 16)	18,3 (7 à 30)
Asn618Ser	58	1 (1,7)	2,9 (0 à 9)	2,9 (0 à 9)
Asp2074Gly	11	3 (27,3)	21,2 (0 à 47)	21,2 (0 à 47)
Arg2150His	57	9 (15,8)	2,2 (0 à 7)	12,2 (1 à 24)
Arg2159Cys	21	3 (14,3)	9,1 (0 à 26)	39,4 (3 à 75)
Trp2229Cys	10	5 (50,0)	41,7 (5 à 78)	41,7 (5 à 78)
Autres mutations	35	17 (48,6)	s. o.	s. o.
Total	333	51	s. o.	s. o.

Abréviation : IC95 % : Intervalle de confiance à 95 %; s. o. : Sans objet.

* Le risque individuel cumulatif de développer des inhibiteurs a été calculé à l'aide de courbes Kaplan-Meier.

Selon les auteurs, les résultats soulignent l'importance du génotypage du gène *F8* chez les patients atteints d'hémophilie A non grave pour estimer leur risque individuel de développer des inhibiteurs lorsqu'exposés à des concentrés de FVIII.

5.4. Validité analytique

Aucune étude de validation analytique du séquençage de nouvelle génération sur les gènes *F8* et *VWF* n'a été repérée.

5.5. Données fournies par le demandeur

Le demandeur a fourni des données de profondeur de lecture par exon pour 16 échantillons (gène *F8* : tableau 8 et annexes G et H; gène *VWF* : tableau 9 et annexe I).

Tableau 8 Couverture du gène *F8* par exon et par échantillon

Gène F8	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 26	X:154065872-154066027	240	224	96	75	224	304	227	107	229	125	129	200	189	208	162	155
exon 25	X:154088707-154088883	169	188	96	78	179	243	182	96	168	106	104	166	162	218	122	125
exon 24	X:154089993-154090141	230	242	109	121	189	315	223	110	251	138	137	203	201	240	170	151
exon 23	X:154091358-154091502	257	259	118	133	235	362	255	120	225	154	157	230	226	330	188	182
exon 22	X:154124352-154124507	282	257	141	121	258	346	315	175	273	145	148	215	231	289	213	181
exon 21	X:154128141-154128226	227	225	100	108	193	298	236	127	211	143	132	207	188	231	164	155
exon 20	X:154129646-154129717	260	252	144	114	227	314	231	145	243	136	117	237	197	309	178	164
exon 19	X:154130326-154130442	246	239	120	123	213	371	275	113	232	130	107	210	242	228	156	155
exon 18	X:154132181-154132363	240	257	94	126	207	338	257	138	248	117	147	228	179	273	201	160
exon 17	X:154132571-154132799	293	285	129	144	222	397	312	150	264	190	153	277	247	283	209	202
exon 16	X:154133086-154133298	259	176	116	105	197	309	289	105	215	148	135	206	198	241	155	132
exon 15	X:154134695-154134848	185	156	101	71	164	178	187	118	131	91	113	140	128	200	134	103
exon 14	X:154156846-154159951	275	249	121	124	226	364	275	131	263	148	141	244	219	294	196	174
exon 13	X:154175973-154176182	272	224	146	138	207	397	256	125	245	150	156	251	229	296	206	204
exon 12	X:154182167-154182317	244	233	120	111	195	323	247	130	259	145	163	209	172	282	168	155
exon 11	X:154185232-154185446	231	242	112	97	226	326	256	122	218	135	134	210	196	301	184	166
exon 10	X:154189350-154189443	228	204	125	111	186	287	265	117	214	103	135	213	173	228	170	144
exon 9	X:154194245-154194416	228	203	106	121	205	294	244	96	207	122	109	226	189	118	143	142
exon 8	X:154194701-154194962	224	221	118	132	198	324	277	113	264	157	136	213	214	139	208	183
exon 7	X:154197606-154197827	252	252	123	119	236	322	251	146	246	122	136	244	218	146	205	142
exon 6	X:154212962-154213078	343	321	114	148	273	457	325	161	285	153	176	288	282	182	225	215
exon 5	X:154215512-154215580	196	217	112	96	167	261	211	112	180	110	101	182	141	123	190	143
exon 4	X:154221211-154221423	270	253	125	94	224	367	242	128	251	161	135	241	219	143	212	181
exon 3	X:154225248-154225370	274	313	114	137	260	418	317	146	306	177	192	261	265	157	219	213
exon 2	X:154227754-154227875	297	241	143	131	211	350	304	102	233	154	124	252	204	139	182	141
exon 1	X:154250685-154250827	248	218	127	127	215	309	286	130	214	149	128	234	224	109	160	179

Couverture >100 >200 >300

Tableau 9 Couverture du gène VWF par exon et par échantillon

Gène VWF	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 52	12:6058181-6058369	179	167	155	166	177	226	171	188	196	194	198	184	158	220	99	249
exon 51	12:6058952-6059049	195	208	170	181	165	248	201	182	185	221	233	192	163	244	117	292
exon 50	12:6061010-6061049	290	258	223	236	192	317	290	236	255	285	309	280	190	325	174	353
exon 49	12:6061557-6061685	273	248	264	287	197	369	272	291	289	310	317	248	265	312	164	381
exon 48	12:6062662-6062760	287	249	226	233	197	302	269	227	259	244	256	227	192	267	180	303
exon 47	12:6076652-6076768	130	123	88	103	75	109	116	146	112	127	130	141	102	132	79	152
exon 46	12:6077293-6077333	179	134	170	156	183	205	121	162	144	200	151	152	153	185	79	175
exon 45	12:6078377-6078557	123	102	121	114	82	143	133	145	120	132	116	96	107	127	61	131
exon 44	12:6080765-6080875	185	164	164	140	134	215	167	187	145	192	143	153	150	182	73	183
exon 43	12:6085277-6085426	146	122	138	142	104	178	151	140	121	170	178	110	127	175	85	150
exon 42	12:6090952-6091157	194	176	174	174	152	222	219	183	168	212	199	192	155	214	135	239
exon 41	12:6092316-6092420	204	168	147	139	180	218	196	214	177	204	206	169	138	225	111	261
exon 40	12:6094211-6094285	230	193	187	164	166	289	205	264	195	244	223	204	171	262	135	273
exon 39	12:6094729-6094831	88	52	64	47	45	71	71	76	73	74	75	59	42	63	27	93
exon 38	12:6100985-6101184	207	212	207	174	175	277	272	211	202	186	222	213	164	256	116	263
exon 37	12:6103028-6103369	186	174	158	162	150	236	190	188	172	180	180	150	143	206	110	203
exon 36	12:6103581-6103773	277	269	282	273	222	398	314	266	271	276	307	261	222	310	222	367
exon 35	12:6105168-6105388	239	250	214	204	198	327	245	221	198	256	273	242	187	242	121	297
exon 34	12:6120783-6120960	142	159	134	138	132	166	163	165	148	181	122	136	118	165	73	173
exon 33	12:6121253-6121296	213	256	258	207	192	303	229	249	237	261	251	233	203	285	199	296
exon 32	12:6122647-6122811	254	255	233	217	231	336	278	269	223	256	294	233	208	266	166	337
exon 31	12:6125255-6125398	231	236	247	209	234	369	253	276	258	283	238	224	215	277	118	334
exon 30	12:6125682-6125822	208	212	198	197	162	268	195	200	223	284	249	197	197	226	136	257
exon 29	12:6125920-6126036	191	149	159	176	132	191	195	207	179	175	205	145	143	170	105	230
exon 28	12:6127531-6128909	146	124	125	126	115	167	146	132	124	133	142	127	123	144	79	174
exon 27	12:6131066-6131201	186	214	197	219	176	322	217	208	227	235	263	188	220	236	158	298
exon 26	12:6131906-6132064	2	2	2	3	1	1	3	2	3	2	1	1	0	1	1	1
exon 25	12:6132797-6132953	224	226	211	226	183	272	222	232	216	234	220	221	202	219	97	262
exon 24	12:6134746-6134859	138	117	111	104	105	192	128	128	124	131	149	141	84	130	63	157
exon 23	12:6135072-6135212	228	165	186	177	181	247	213	204	174	246	196	198	169	212	116	256
exon 22	12:6138508-6138654	225	217	226	239	178	284	253	215	200	242	226	207	192	245	150	275
exon 21	12:6140610-6140744	207	186	199	151	171	269	202	187	201	205	202	171	159	218	134	237
exon 20	12:6143854-6143992	232	191	172	186	145	251	223	208	191	218	206	203	174	206	110	243
exon 19	12:6145554-6145657	204	190	188	194	149	248	233	167	174	207	187	196	168	190	113	215
exon 18	12:6153457-6153617	224	191	173	200	163	225	226	216	183	210	191	210	146	210	119	273
exon 17	12:6155889-6155983	242	228	218	195	190	346	269	264	221	254	301	246	178	268	175	331
exon 16	12:6161709-6161949	185	157	149	159	156	235	184	163	165	199	199	168	157	219	98	183
exon 15	12:6166023-6166238	14	13	17	13	15	26	23	22	16	19	17	16	15	23	7	21
exon 14	12:6167015-6167210	77	70	70	73	67	101	72	84	59	93	93	58	56	72	46	73
exon 13	12:6172120-6172220	115	84	94	87	99	140	117	101	93	128	111	101	88	89	49	107
exon 12	12:6173412-6173550	112	119	104	103	114	150	109	104	99	96	118	103	104	128	69	153
exon 11	12:6174303-6174439	223	211	240	235	209	301	285	237	220	272	238	228	202	251	113	298
exon 10	12:6180463-6180509	240	195	216	229	203	286	208	208	232	229	247	221	178	236	126	278
exon 9	12:6181497-6181608	147	128	126	117	127	196	139	154	154	159	143	112	89	159	78	180
exon 8	12:6182785-6182907	186	241	200	230	204	275	237	205	214	256	223	207	171	243	127	256
exon 7	12:6184501-6184717	118	127	113	140	90	138	135	119	111	159	115	115	103	135	48	146
exon 6	12:6204626-6204750	242	229	240	247	256	337	251	269	278	284	263	242	232	285	145	334
exon 5	12:6219540-6219748	254	271	249	245	230	376	280	263	250	311	295	234	228	284	149	346
exon 4	12:6220032-6220134	244	193	200	206	210	254	214	249	213	232	218	211	176	270	140	251
exon 3	12:6230340-6230504	170	181	172	119	131	200	190	164	160	187	199	162	146	195	80	221
exon 2	12:6232308-6232362	156	161	180	180	161	251	159	193	191	189	170	144	162	201	138	195
	Couverture	>100	>200	>300													

Le SNG a conservé une qualité de lecture ($Q \geq 30$) pour 94,1 % et 94,6 % de la cible dans les 2 essais de validation.

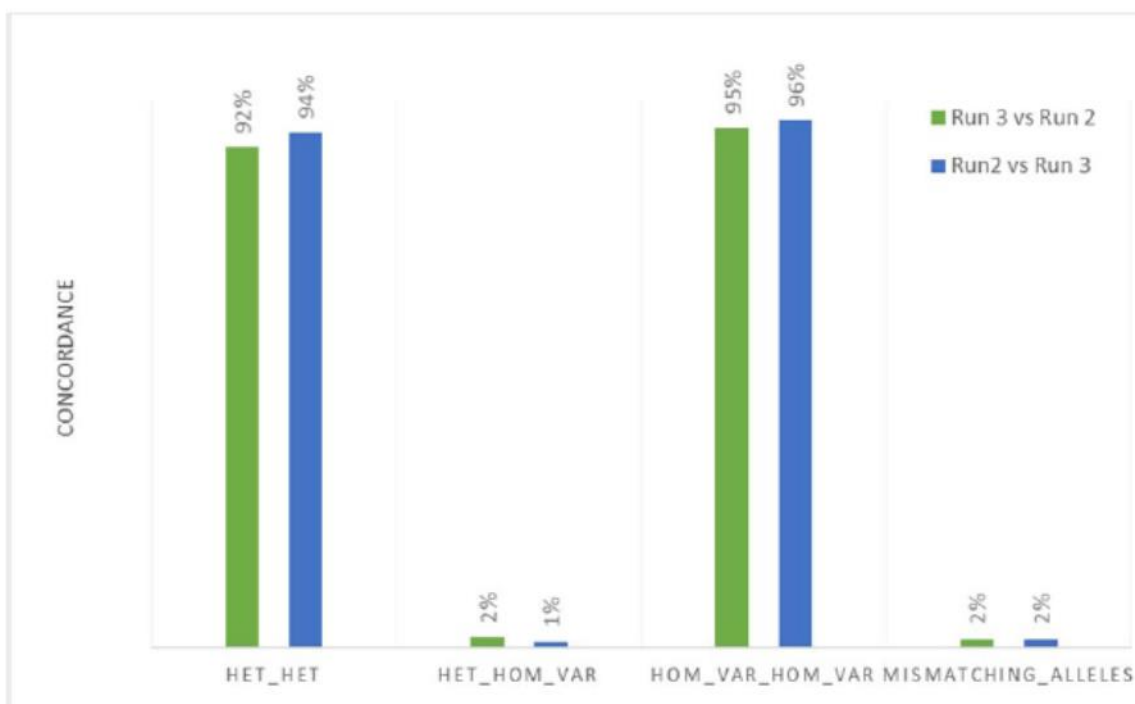
Le SNG a été validé par comparaison avec le séquençage de Sanger sur 16 échantillons témoins. Une concordance de 100 % a été obtenue entre les 2 méthodes (tableau 10).

Tableau 10 Performance du séquençage de nouvelle génération contre le séquençage de Sanger

CTRLs	Mutations détectées par analyse Sanger		Mutations détectées par analyse NGS		Concordance	Couverture position ¹	Couverture allèle mutée ²
	F8	VWF	F8	VWF	Oui/Non		
échan1	-	p.Pro1413Gln	-	p.Pro1413Gln	Oui	184	93
échan2	p.Asp2150Ala	-	p.Asp2150Ala	-	Oui	251	133
échan3	-	p.Arg1308Cys	-	p.Arg1308Cys	Oui	144	68
échan4	-	p.Thr791Met het; p.Pro812Argfs*31	-	p.Thr791Met het; p.Pro812Argfs*31	Oui	164;205	85;98
échan5	p.Glu739Lys	p.Pro1413Leu	p.Glu739Lys	p.Pro1413Leu	Oui	195	87
échan6	-	p.Arg1374His	-	p.Arg1374His	Oui	176	95
échan7	p.Trp274Ser	-	p.Trp274Ser	-	Oui	228	89
échan8	p.Asn637Ser	-	p.Asn637Ser	-	Oui	121	120
échan9	-	p.Val1229Gly; p.Asn1231Thr	-	p.Val1229Gly; p.Asn1231Thr	Oui	124; 119	124; 119
échan10	p.Met110Val	-	p.Met110Val	-	Oui	172	171
échan11	p.Gly2000Ala	-	p.Gly2000Ala	-	Oui	98	97
échan12	-	-	-	-	-	-	-
échan13	-	p.Arg854Gln	-	p.Arg854Gln	Oui	225	225
échan14	-	-	-	-	-	-	-
échan15	p.Arg2326*	-	p.Arg2326*	-	Oui	136	61
échan17	p.Lys1031Leufs*9	-	p.Lys1031Leufs*9	-	Oui	126	126
	¹ Couverture de la position (allèle normale et mutée)						
	² Couverture de l'allèle mutée						

Abréviations : CTRLs : Échantillons contrôles; échan : Échantillons; NGS : Séquençage de nouvelle génération.

Un échantillon a été testé à 2 reprises et la concordance entre les variants détectés aux 2 reprises a été déterminée selon leur présence à l'état hétérozygote, homozygote, hétérozygote dans une analyse et homozygote dans l'autre ou de mésappariements. La concordance entre les 2 essais a été jugée excellente (Figure 1).



Abréviations : Het : Hétérozygote; hom : Homozygote; run : Essai; var : Variants.

Figure 1 Concordance de détection des variants de l'échantillon 13 lors de 2 essais distincts

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* de l'analyse par séquençage de nouvelle génération (SNG) des gènes *F8* et *VWF* pour diagnostiquer l'hémophilie A légère et modérée et la maladie de von Willebrand. Les coûts liés à ce test sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective du MSSS. L'analyse porte sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans le tableau 11. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- L'analyse proposée par le demandeur serait complémentaire au TAAN permettant la détection de l'inversion de l'intron 22 et de l'intron 1 (code : 25026) chez les patients atteints d'hémophilie A grave. L'analyse serait aussi complémentaire aux tests 20087, 20122, 20143 pour les patients atteints d'hémophilie A et aux tests 20088, 20089, 20090 et 20009 pour les patients atteints de la maladie de von Willebrand. Toutes ces analyses figurent actuellement au *Répertoire*.
- L'analyse proposée pourrait toutefois remplacer le test suivant : von Willebrand type 2 (2A, 2B, 2M, 2N); *VWF* (exons 18 à 21 et 28 à 31) mutations associées (séquençage) (code : 25070) figurant au *Répertoire*. La valeur pondérée de cette analyse est de 227. En 2017-2018, 131 analyses ont été effectuées pour un coût total de 29 737 \$.
- En 2016-2017, 3 analyses de séquençage du gène *VWF* ont été acheminées

hors Québec pour un coût moyen par analyse de 3 718 \$. Dans cette même période, 6 analyses de séquençage pour le gène *F8* ont également été acheminées hors Québec pour un coût moyen par analyse de 718 \$. Le rapatriement de ces envois hors Québec serait prévu dès la première année suivant l'ajout du SNG des gènes *F8* et *VWF* au *Répertoire*.

- Les patients suspectés d'être atteints de la maladie de von Willebrand de type 2N négatifs au séquençage du gène *VWF* (exons 18-21, 28-31 [code : 25070]), recevront un séquençage complet des régions codantes du gène *VWF*. Actuellement, ce test est réalisé dans le cadre du National Program for Hemophilia Mutation Testing à Kingston, en Ontario.
- Selon les informations soumises par le demandeur, l'analyse proposée pourrait combler ces envois au laboratoire de Kingston, dont le financement dépend de l'Association of Hemophilia Clinic Directors of Canada. Ce financement devrait prendre fin prochainement, selon le demandeur.
- Il est estimé que 65 échantillons pourraient actuellement requérir un envoi au laboratoire de Kingston pour y être analysés. Advenant que le programme ne soit plus financé, ces échantillons devraient être acheminés chez Prevention Genetics au Wisconsin aux États-Unis, où le coût⁹ de l'analyse par SNG est de 1 371,01 \$ pour une analyse combinée des 2 gènes.
- Le demandeur anticipe que 25, 25 et 30 analyses seraient réalisées au cours de chacune des trois prochaines années pour le diagnostic de l'hémophilie A, alors que 125 analyses par année seraient effectuées au cours de chacune des trois prochaines années pour le diagnostic de la maladie de von Willebrand.
- Il est prévu que toutes ces analyses soient réalisées au CHU Sainte-Justine et qu'elles permettraient de répondre aux besoins de l'ensemble du Québec.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur est de 576,51.

⁹ Prix obtenu en dollars américains (1 030 USD pour l'analyse combinée des 2 gènes), puis converti en dollars canadiens selon le taux de change en vigueur le 20 novembre 2018.

Tableau 11 Coûts liés à l'introduction au Répertoire de l'analyse par SNG des gènes *F8* et *VWF* pour le diagnostic de l'hémophilie A légère et modérée et de la maladie de von Willebrand

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : Sans ajout de l'analyse par SNG des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i>				
Analyses exons 18-21 et 28-31 du gène <i>VWF</i> (code : 25070)				
Analyses	131	131	131	393
Coûts	29 737 \$	29 737 \$	29 737 \$	89 201 \$
Envois hors Québec pour séquençage				
Analyses gène <i>F8</i>	6	6	6	18
Coûts	718 \$	718 \$	718 \$	12 924 \$
Analyses du gène <i>VWF</i>	3	3	3	9
Coûts	11 154 \$	11 154 \$	11 154 \$	33 462 \$
Envois potentiels chez Prevention Genetics				
Nombre d'analyses	65	65	65	195
Coûts	73 542 \$	73 542 \$	73 542 \$	220 626 \$
Nouveau scénario : Avec ajout de l'analyse par SNG des gènes <i>F8</i> et <i>VWF</i>				
Analyses SNG <i>F8</i> et <i>VWF</i>	150	150	155	455
Coûts	86 477 \$	86 477 \$	89 359 \$	262 313 \$
Impact net 1*	Situation dans laquelle le séquençage des régions codantes est fait dans le cadre du National Program for Hemophilia Mutation Testing			
	41 278 \$	41 278 \$	44 160 \$	126 716 \$
Analyses de sensibilité†	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			100 772 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			153 235 \$
Impact net 2*	Situation dans laquelle le séquençage des régions codantes est réalisé chez Prevention Genetics			
	-47 838 \$	-47 838 \$	-44 956 \$	-140 632 \$
Analyses de sensibilité†	Pour 3 ans, la réduction de coûts la plus élevée			-169 423 \$
	Pour 3 ans, la réduction de coûts la plus faible			-115 954 \$

* Impact net 1 : Coûts du SNG (coûts des analyses 25070 + coûts des envois hors Québec). Impact net 2 : Coûts du SNG (coûts des analyses 25070 + coûts des envois hors Québec + coûts des analyses des régions codantes chez Prevention Genetics).

† Les coûts présentés en analyses de sensibilité considèrent une variation du nombre d'analyses de 10 %.

Ainsi, l'ajout de l'analyse par SNG des gènes *F8* et *VWF* pour le diagnostic de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 127 000 \$ au cours des trois premières années, et ce, considérant que le séquençage des régions codantes du gène *VWF* serait réalisé dans le cadre du National Program for Hemophilia Mutation Testing. En revanche, si ces analyses étaient réalisées chez Prevention Genetics, l'ajout de l'analyse par SNG des gènes *F8* et *VWF* au Répertoire pourrait engendrer une réduction de coûts d'environ 141 000 \$ au cours des trois premières années.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

La disponibilité des analyses de séquençage des gènes *F8* et *VWF* sans frais réalisées à Kingston constitue un enjeu puisque celles-ci vont engendrer des coûts après l'interruption de leur financement.

Un volume d'analyses supplémentaires pourrait survenir par l'analyse rétrospective de patients qui ont été investigués pour l'hémophilie A ou la maladie de von Willebrand.

Le séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* tel que proposé dans sa forme actuelle ne permet pas de détecter des duplications ou de grandes délétions. D'autres gènes absents du panel pourraient aussi expliquer quelques cas. Par conséquent, certains patients pourraient demeurer sans diagnostic moléculaire.

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Hémophilie A

Le Nordic Hemophilia Council (NHC) [Armstrong *et al.*, 2015] est en faveur du diagnostic génétique pour prédire le risque de développer des inhibiteurs, pour le diagnostic des porteurs et le diagnostic prénatal. Il recommande que les 26 exons du gène *F8* soient séquencés chez les patients atteints d'hémophilie A grave qui ne présentent pas d'inversion des introns 1 et 22 et chez les patients atteints d'hémophilie A non grave.

Lorsque les analyses génétiques sont disponibles, la Fédération mondiale de l'hémophilie recommande qu'elles soient offertes aux femmes risquant d'être porteuses, afin de faciliter le conseil génétique et le diagnostic prénatal [Srivastava *et al.*, 2013].

Selon la United Kingdom Haemophilia Centre Doctor's Organisation (UKHCDO), il est recommandé que tous les enfants hémophiles soient investigués pour établir la mutation causale du gène *F8* [Keeney *et al.*, 2010]. La stratégie diagnostique privilégiée est que :

- les patients atteints d'hémophilie A grave soient d'abord testés pour l'inversion de l'intron 22, puis de l'intron 1 (cette approche devrait détecter une mutation chez 45 % à 50 % de ces patients);
- les autres patients atteints d'hémophilie A grave ainsi que ceux dont l'hémophilie A est modérée ou légère requièrent l'analyse mutationnelle complète du gène *F8*.

Maladie de von Willebrand

En 2014, la UKHCDO a recommandé que les analyses génétiques soient utilisées lorsqu'elles sont bénéfiques pour la clarification du diagnostic ou de la prise en charge des patients [Laffan *et al.*, 2014]. L'analyse du gène *VWF* pourrait permettre la distinction entre la maladie de von Willebrand de type 2N de l'hémophilie A légère à modérée, et la distinction entre la maladie de von Willebrand de type 2B de la maladie de von Willebrand liée aux plaquettes. L'analyse génétique permet également de clarifier le risque de transmission héréditaire et, dans certains cas, le type de maladie de von Willebrand.

En 2012, la Société canadienne de l'hémophilie a produit un algorithme diagnostique de la maladie de von Willebrand, qui indique la possibilité de réaliser des analyses génétiques [SCH, 2012].

En 2012, l'American Society of Hematology a révisé un guide de pratique sur l'évaluation et la prise en charge des patients atteints de la maladie de von Willebrand, et le séquençage du gène *VWF* fait partie de l'algorithme diagnostique (Annexe J) [ASH, 2012].

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF*

La recommandation de l'INESSS

- ☐ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☒ Introduction conditionnelle de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'utilité clinique de l'analyse est reconnue.
- ✓ Le centre demandeur devrait fournir un algorithme d'utilisation de l'analyse plus clair précisant l'usage des analyses phénotypiques.
- ✓ Le laboratoire demandeur doit produire un plan de validation détaillé en s'appuyant sur la norme CSA Z 316.8-F18 et le faire approuver par l'INESSS.
- ✓ L'INESSS recommande que l'introduction soit conditionnelle à la production des données de validation analytique pré spécifiées par le plan de validation.

ANNEXE A

Classification des sous types de maladies de von Willebrand

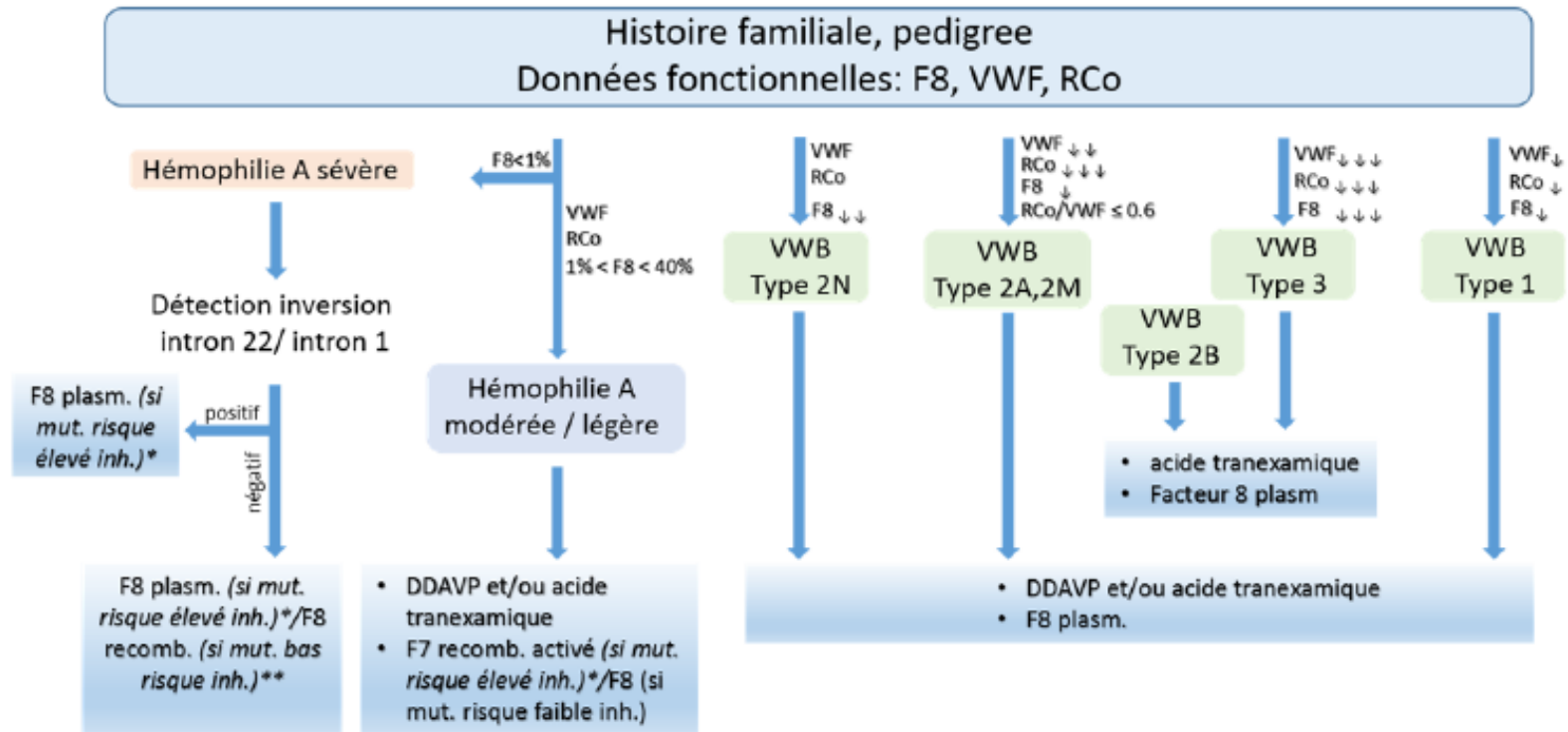
TYPE	DESCRIPTION	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES
1	Déficit quantitatif partiel en FvW	Niveau faible de FvW avec concordance fonctionnelle du FvW.	Présentation la plus commune de la MvW décelée par les laboratoires. La plupart des patients présentent un niveau moyennement réduit de FvW.
2A	Adhésion plaquettaire dépendante du FvW réduite et un déficit sélectif du multimère de FvW de haut poids moléculaire	Perte du multimère de FvW. Habituellement un niveau faible de FvW, avec discordance de l'activité du FvW. (ratios de liaison à GP1b /Ag et de liaison au collagène /Ag < 0,7).	Globalement considérée comme la présentation la plus fréquente de la MvW de type 2.
2B	Affinité accrue du FvW pour GP1b	Niveau de FvW normal à faible, typiquement avec activité FvW discordante (ratios de liaison à GP1b /Ag et de liaison au collagène /Ag généralement < 0,7), perte du FvW de haut poids moléculaire. Des cas atypiques peuvent présenter un profil différent.	Forme rare (généralement 10 % à 20 % du type 2 (~1 à 5 cas par million d'habitants). Définie par une réponse accrue avec un essai RIPA.
2M	Agglutination plaquettaire dépendante du FvW réduite sans déficit sélectif du multimère de FvW de haut poids moléculaire	Niveau de FvW normal à faible, habituellement avec discordance fonctionnelle du FvW détectée par la liaison à GPIb /Ag généralement < 0,7 et avec ratio de liaison au collagène /Ag relativement normal. Le FvW de haut poids moléculaire est présent, mais le multimère peut présenter d'autres anomalies.	Forme sous-estimée de la MvW de type 2. Probablement aussi commune que le type 2A. De rares cas présentent un ratio faible de liaison au collagène /Ag avec un ratio normal de liaison à GPIb /Ag. Certains cas présentent des ratios faibles de liaison au collagène /Ag et de liaison à GPIb /Ag.
2N	Affinité de liaison pour le facteur VIII fortement réduite	Définie par l'essai FvW : FVIIIIB, avec un ratio faible de FVIIIIB /FvW (~0,5 pour les mutations hétérozygotes et < 0,3 pour des anomalies génétiques plus graves.	Forme rare (généralement < 10 %) de la MvW de type (~1 à 5 cas par million d'habitants).
3	Déficit quasi-complet du FvW	Typiquement défini par un niveau de FvW < 2 U/dl et FVIII < 10 U/dl.	Forme rare de MvW dans les pays développés (~1 à 5 cas par million d'habitants), mais disproportionnellement plus commune dans les pays en développement.

Source : Favaloro, 2017.

Abréviations : Ag : Niveau d'antigène; FVIII : Facteur VIII; FvW : Facteur von Willebrand; GP1b : Glycoprotéine 1b; MvW : Maladie de von Willebrand; RIPA : Essai d'agglutination plaquettaire induit par la ristocétine, de l'anglais *Ristocetin-induced platelet agglutination assay*).

ANNEXE B

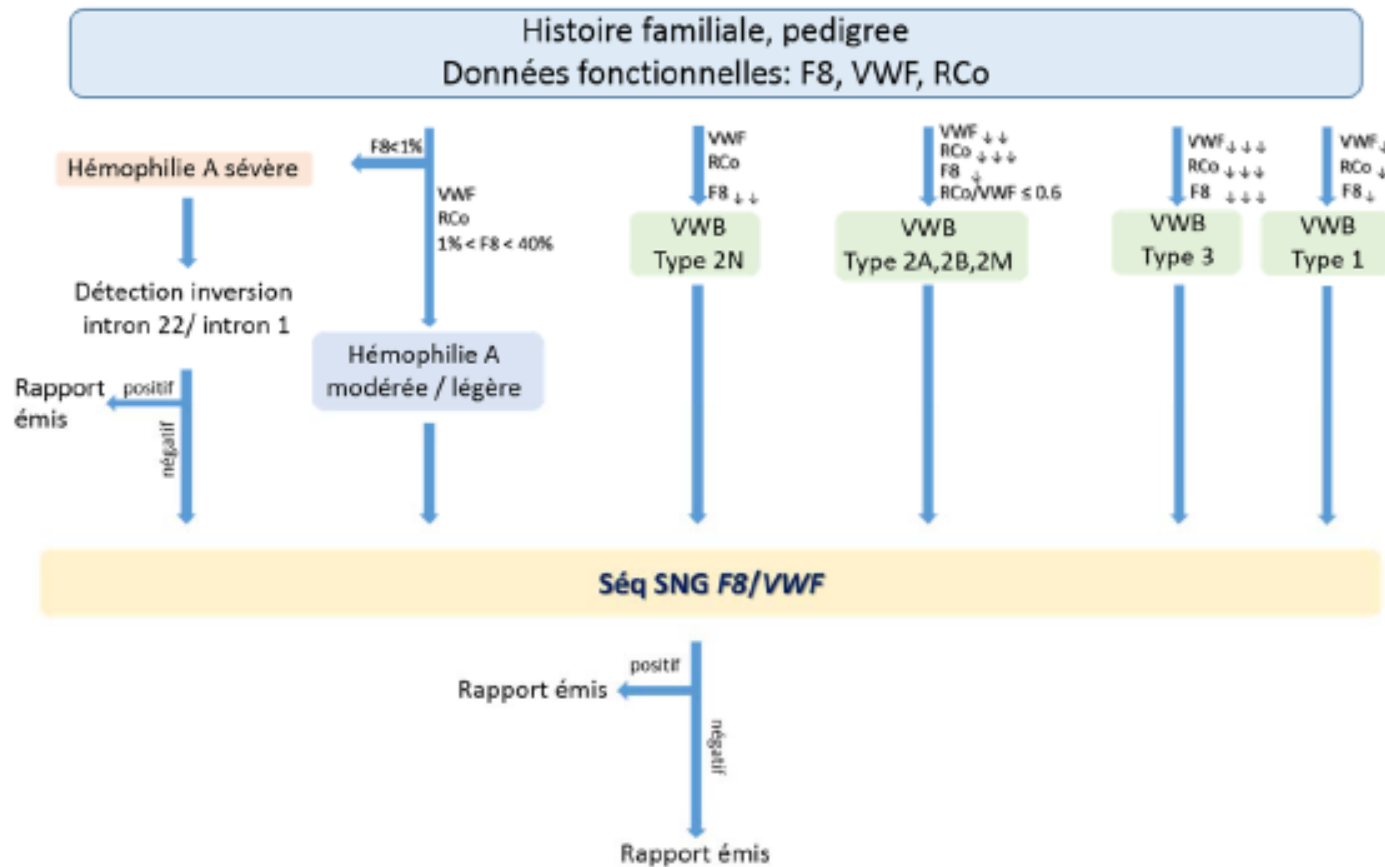
Algorithme de traitement de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand



Abréviations : DDAVP : Desmopressine; inh : Inhibiteur; mut. : Mutation; plasm. : Plasmatique;
VWB : von Willebrand; VWF : Facteur von Willebrand; RCo : Activité du FvW à se lier à GPIbR.

ANNEXE C

Algorithme diagnostique de l'hémophilie A et de la maladie de von Willebrand proposé par le demandeur



ANNEXE D

Résumé des études sur la valeur diagnostique de séquençage de nouvelle génération des gènes *F8* et *VWF* réalisé en parallèle

BASTIDA ET AL., 2017						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
TESTS	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL	MUTATIONS		
Facteur C, temps de coagulation, FvW : Ag, FvW : Ac,	102 patients 97 dx phénot. HA : 78 -20 graves, -58 mod/lég HB : 19 5 femmes : PO (HA) : 3 F FVIIIId : 2 F	Algorithme diagnostique proposé à la figure 1. HA sévères : 1) IVS-22, 2) IVS-1, 3) Autres HA sévères, HA modérés et légers et HB par SNG (<i>F8</i> , <i>F9</i> , <i>VWF</i>), 4) <i>F8</i> par MLPA. SNG MiSeq de toutes les régions des gènes : exons, séquences flanquantes, sites d'épissages, régions régulatrices et introns. Couverture minimale de 100x/base. Couverture de lecture moyenne des 3 gènes : 648x. 90,5 % des régions ciblées couvertes à 50x	HA graves : 20 HA mod/lég : 52 MvW : 6 HB : 19 Femmes porteuses obligatoires de HA : 3 Femmes symptomatiques : 2	IVS-22 : 11; SNG : 11; délétion par MLPA : 1 <i>F8</i> : 51; sans mutation : 1 <i>VWF</i> : 6 <i>F9</i> : 19 IVS-22 :1; <i>F8</i> : 2 <i>VWF</i> : 2	SNG : HA M/L => 6 MvW HA porteuses => 2 MvW 8 diagnostics HA corrigés par MvW : Type 2N : 2 diagnostics et 3 porteurs; Type 1 : 3 diagnostics	L'algorithme a permis de détecter des mutations <i>F8</i> et <i>F9</i> , d'assigner correctement des diagnostics de MvW et d'établir le statut des femmes porteuses dans 101/102 (99 %)

BASTIDA ET AL., 2016						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
MÉTHODES	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL	MUTATIONS		
5 déjà validées par Sanger Historique détaillé de tendance aux saignements Diagnostics de déficit pour divers facteurs de coagulation.	13H, 7F FVIII : 8 MvW : 2 FVII : 2 FIX : 1 FX : 1 FXI : 2 FXIII : 1 Fibrinogène : 3	SNG MiSeq : Panel de 23 gènes pour DHCS. Tous les exons, séquence 3' non traduite, régions flanquantes. <i>F2, F5, F7, F8, F9, F10, F11</i> et autres SNG validé par séquençage de Sanger.	HA : 7 MvW : 1 MvW : 2	<i>F8</i> : 7 <i>VWF</i> : 1 hmz <i>VWF</i> : 2 htz	HA => 1 MvW	Le diagnostic moléculaire a permis de modifier le diagnostic d'une patiente suspectée d'être porteuse symptomatique d'hémophilie A. Chez celle-ci, le SNG a permis de détecter une mutation homozygote du gène <i>VWF</i> .

Abréviations : DHCS : Désordre héréditaire de la coagulation sanguine; Dx : Diagnostic; F : Femme; FVIIIId : Déficience en FVIII; H : Homme; HA : Hémophilie A; HB : Hémophilie B; hmz : Homozygote; htz : Hétérozygote; IVS-1 : Inversion de l'intron 1 du gène *F8*; IVS-22 : Inversion de l'intron 22 du gène *F8*; MLPA : Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligature, de l'anglais *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; MvW : Maladie de von Willebrand; Phénot. : Phénotypique; PO : Porteur obligatoire; SNG : Séquençage de nouvelle génération; FvW : Ag : Concentration d'antigène du FvW; FvW : Ac : Activité du FvW.

ANNEXE E

Résumé des études sur la valeur diagnostique de séquençage de nouvelle génération des gènes *VWF*

BORRÀS ET AL., 2017 (N = 556)						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE DE MVW (N = 442)		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS (153/556)	CONCLUSION
MÉTHODES	TYPES DE MVW (N)	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL N = 480	MUTATIONS (704 VARIANTS)		
FWW : Ag, FWW : RCo, FWW : CB, FWW : FVIIIIB, Anomalies multimériques, Score de saignement, RIPA	Type 1 : 126	SNG MiSeq, 61 amplicons VWF : exons 1 à 52, sites d'épissage, ~1300 pb du promoteur.	129	Type 1 et 1H : 216 variants chez 146 pts (91,8 %), 85 variants différents. 60 mutations potentielles différentes, dont 1 par MLPA	13 reclassés 16 ajoutés (4 étaient exclus)	La caractérisation moléculaire des patients MvW permet une classification précise. Le diagnostic de 27,5 % des patients a été corrigé après le diagnostic phénotypique initial : 43 ont été réinclus, 5 patients ont été exclus et 105 patients ont été reclassés. 68 patients de classification incertaine ont été définitivement classés par SNG.
	Type 1H : 22		30		8 reclassés 16 ajoutés (9 étaient exclus)	
	Type 3 : 44		42		3 reclassés 1 ajouté	
	Porteurs type 3 : 5	Les mutations détectées ont été validées par Sanger.	26	MLPA	6 reclassés 27 ajoutés (19 étaient exclus)	
	Type 2A : 59		111		2 reclassés 54 ajoutés	
	Type 2A/2M : 38	Dél./dup. par MLPA sur 5 patients	34	4 variants détectés	7 reclassés 3 ajoutés	
	Type 2B : 23	Analyse des microsatellites par PCR multiplex fluorescente.	35	20 variants différents sur seulement 5 résidus	2 reclassés 14 ajoutés	
	Type 2M : 32		39	31 variants	1 reclassés 8 ajoutés (2 étaient exclus)	
	Type 2N : 9	Les régions faiblement couvertes ont été complétées par Sanger.	9	14 variants différents	Tous concordants	
	Porteurs type 2N : 10		11		1 ajouté (était exclus)	
	Type incertain : 74		14		68 reclassés 8 ajoutés (7 étaient exclus)	
	Exclus : 114		76		43 retirés, 5 ajoutés	

FIDALGO ET AL., 2016						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE (N = 92)		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
MÉTHODES	TYPE DE MVW (N)	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL (N)	MUTATIONS		
FVIII:C FWW:Ag FWW:RCo RIPA FWW:CB FWW : FVIIIIB Score de saignement	Type 1 : 7	Sanger : Types 1 et 3 : toute la séquence codante. Types 2B et 2M : exon 28 seulement. Type 2A : d'abord l'exon 28 puis les exons 11 à 16, 24 à 26, 51 et 52 au besoin. Type 2N : exons 18 à 25. Pour confirmer le diagnostic différentiel entre type 2B et MvW-LP : exon 2 de <i>GP1BA</i>. SNG : Exons 1 à 52 et au moins 20 paires de bases dans les régions flanquantes. MLPA si absence de mutation par séquençage.	7 (6 par SNG et 1 par MLPA)	1 htz pour 1 mutation associée à MvW type 3. 1 htz pour 1 mutation dominante générant un phénotype 2M chez la mère.	4 patients	Le SNG s'est avéré être une excellente technologie qui permet un diagnostic plus rapide et présente un avantage économique important. Ces résultats appuient l'ajustement à l'algorithme diagnostique proposé, qui introduit le séquençage complet du gène <i>VWF</i> par SNG lorsque FvW:RCo < 30 % ou que le ratio FVIII/FvW:Ag < 0.5. Cette approche a permis de faire la distinction entre des situations cliniques de symptômes similaires, mais de causes génétiques différentes telles que l'hémophilie A modérée et la MvW type 2N, le syndrome de Bernard-Soulier et la MvW type 2B ainsi que la MvW type 2B et la MvW liée aux plaquettes.
	Type 3 : 15		14	1 htz cmp dont le père a un phénotype MvW type 1 léger et la mère est asymptomatique. 13 hmz 1 variant homozygote dont la contribution demeure à clarifier.		
	2A : 9		9	9 avec des mutations concordantes.		
	2B : 6		5/6	1 était suspecté de syndrome de Bernard-Soulier =>2B 1 avec seulement 1 mut dans <i>GP1AB</i> =>MvW liée aux plaquettes.		
	2M : 11		11	1 patient htz composé dont la mère a un phénotype type 1.		
	2N : 12		12/12	1 htz cmp (type 2N/3) 2 patients avaient préalablement été classés HA léger.		

BOYLAN <i>ET AL.</i> , 2015						
DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE		DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE			DIAGNOSTICS MODIFIÉS	CONCLUSION
MÉTHODES	DIAGNOSTIC PHÉNOTYPIQUE (N)	MÉTHODES ET RÉGIONS SÉQUENCÉES	DIAGNOSTIC FINAL (N)	MUTATIONS		
FvW : Ag FvW : FVIIIIB		SNG MiSeq <i>VWF</i> Exons +20 pb Mutations validées par Sanger			4 diagnostics de <u>MvW de type 3</u> parmi 37 patients avec un diagnostic HA sans mutation F8.	Les auteurs ont conclu que l'ajout des analyses phénotypique et génotypique du FvW à l'analyse du gène F8 chez les patients qui ont reçu un diagnostic d'hémophilie A permettrait de révéler des cas d'erreur diagnostique, bien que la cause de la maladie puisse ne pas être déterminée chez certains patients.
37 HA sans mutation <i>F8</i> , dont 14 identifiés avec une concentration réduite de FvW	MvW type 3 suspectée : 4		MVW type 3 : 4	Mutation <i>VWF</i> homozygote ou hétérozygote composite.		
	MvW suspectée : 8		HA	3 porteurs d'une mutation <i>VWF</i> qui peut contribuer à un phénotype de saignement.	1 diagnostic de <u>MvW de type 1</u> parmi 65 patients avec un diagnostic HA avec mutation F8.	
	Cas non suspectés :		HA	3 porteurs d'une mutation <i>VWF</i> qui peut contribuer à un phénotype de saignement.		
65 non graves avec mutations <i>F8</i> (témoins)	MvW type 1 ou 2 suspectée : 1		MvW type 1 : 1	hétérozygote	11 autres patients présentent des mutations pouvant contribuer à des symptômes de saignements d'hémophilie A.	
	MvW suspectée : 6		HA	Aucun ne présente de mutation du gène <i>VWF</i> .		
	Cas non suspectés : 59		HA	5 porteurs d'une mutation <i>VWF</i> contribuant au phénotype de saignement.		

Abréviations : CI : Classification incertaine; Cmp : Composé; Dél./dup. : Délétion ou duplication; F : Familles; GD : Grande délétion; HA : Hémophilie A; hnz : Homozygote; htz : Hétérozygote; MLC : Mutation de liaison au collagène; MLPA : Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligature, de l'anglais *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*; MvW : Maladie de von Willebrand; MvW-LP : Maladie de von Willebrand liée aux plaquettes (gène *GP1BA*); pb : Paires de bases; PCR : Réaction en chaîne de polymérase; pts : Patients; RIPA : Test d'agrégation des plaquettes induit par la ristocétine (Ristocetin-Induced Platelet Aggregation); SNG : Séquençage de nouvelle génération; « FvW : Ag » : Concentration de FvW; « FvW : CB » : Test de liaison du FvW au collagène; « FvW : FVIIIIB » : Test de liaison du FvW au facteur VIII; « FvW : RCo » : Activité du FvW, de l'anglais *Ristocetin Cofactor*.

ANNEXE F

Résumé de l'étude sur la relation entre le génotypage *F8* et le développement d'inhibiteurs du facteur VIII chez les patients atteints d'hémophilie A non grave

ECKHARDT ET AL., 2013			
OBJECTIF	PATIENTS, MÉTHODE	RÉSULTATS	CONCLUSION
Analyser l'association entre le développement des inhibiteurs et les mutations <i>F8</i> chez les patients atteints d'hémophilie A non grave, en tenant compte de l'exposition cumulative à des concentrés de FVIII.	<u>Patients :</u> 2711 patients HA non grave (facteur VIII : 2 à 40 UI/dl) <u>Exclusion :</u> - Centres qui ont génotypé < 70 % des patients. - Patients référés à l'étude parce qu'ils présentaient déjà des inhibiteurs. Patients inclus : 1112 <u>Génotype <i>F8</i> connu :</u> 895/1112 patients (81 %) 51/59 patients avec inhibiteurs (86 %) <u>Méthodes d'analyse :</u> concentration de facteur VIII, concentration de facteurs von Willebrand, activité du facteur von Willebrand. Inhibiteurs quantifiés par la méthode Bethesda originale ou par l'essai modifié Nijmegen.	Patients avec inhibiteurs : 59/1112 (incidence cumulative 5,3 %; IC95 % : 4,0 à 6,6). Risque de développer des inhibiteurs selon le nombre de jours d'exposition : 20 : 3,5 % (IC95 % : 2,1 à 4,9); 50 : 6,7 % (IC95 % : 4,5 à 8,9); 100 : 13,3 % (IC95 % : 9,6 à 17,0). Association inhibiteurs et génotype : 19 mutations faux-sens ont été associées au développement d'inhibiteurs (333 patients). Risque de développement d'inhibiteurs selon la mutation : 0 % à 42 % après 50 jours d'exposition. Le tableau 7 détaille chaque mutation. Disparition des inhibiteurs : 42/59 patients : Inhibiteurs indétectables après une période médiane de 45 semaines (IQR : 13 à 108) -12 : Après thérapie d'éradication; -30 : Disparition spontanée; -14 : inhibiteurs sont demeurés présents; -3 : Statut des inhibiteurs inconnu à la fin du suivi.	L'étude démontre le potentiel du génotypage <i>F8</i> pour estimer les risques individuels de développer des inhibiteurs chez les patients atteints d'hémophilie A non grave.

Abréviations : FVIII : Facteur VIII; FvW : Facteur von Willebrand; HA : Hémophilie A; N : Nombre.

ANNEXE G

Pourcentage de la cible codante couverte par au moins 50 lectures pour le gène *F8* obtenue par exon par échantillon

Gène <i>F8</i>	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 26	X:154065872-154066027	100	100	100	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 25	X:154088707-154088883	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 24	X:154089993-154090141	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 23	X:154091358-154091502	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 22	X:154124352-154124507	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 21	X:154128141-154128226	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 20	X:154129646-154129717	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 19	X:154130326-154130442	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 18	X:154132181-154132363	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 17	X:154132571-154132799	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 16	X:154133086-154133298	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 15	X:154134695-154134848	100	100	100	73	100	100	100	100	100	94	100	100	100	100	100	90
exon 14	X:154156846-154159951	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 13	X:154175973-154176182	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 12	X:154182167-154182317	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 11	X:154185232-154185446	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 10	X:154189350-154189443	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 9	X:154194245-154194416	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 8	X:154194701-154194962	100	100	100	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 7	X:154197606-154197827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 6	X:154212962-154213078	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 5	X:154215512-154215580	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 4	X:154221211-154221423	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 3	X:154225248-154225370	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 2	X:154227754-154227875	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 1	X:154250685-154250827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ANNEXE H

Pourcentage de la cible codante couverte par au moins 30 lectures pour le gène *F8* par exon par échantillon

Gène <i>F8</i>	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 26	X:154065872-154066027	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 25	X:154088707-154088883	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 24	X:154089993-154090141	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 23	X:154091358-154091502	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 22	X:154124352-154124507	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 21	X:154128141-154128226	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 20	X:154129646-154129717	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 19	X:154130326-154130442	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 18	X:154132181-154132363	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 17	X:154132571-154132799	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 16	X:154133086-154133298	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 15	X:154134695-154134848	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 14	X:154156846-154159951	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 13	X:154175973-154176182	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 12	X:154182167-154182317	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 11	X:154185232-154185446	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 10	X:154189350-154189443	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 9	X:154194245-154194416	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 8	X:154194701-154194962	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 7	X:154197606-154197827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 6	X:154212962-154213078	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 5	X:154215512-154215580	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 4	X:154221211-154221423	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 3	X:154225248-154225370	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 2	X:154227754-154227875	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 1	X:154250685-154250827	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

ANNEXE I

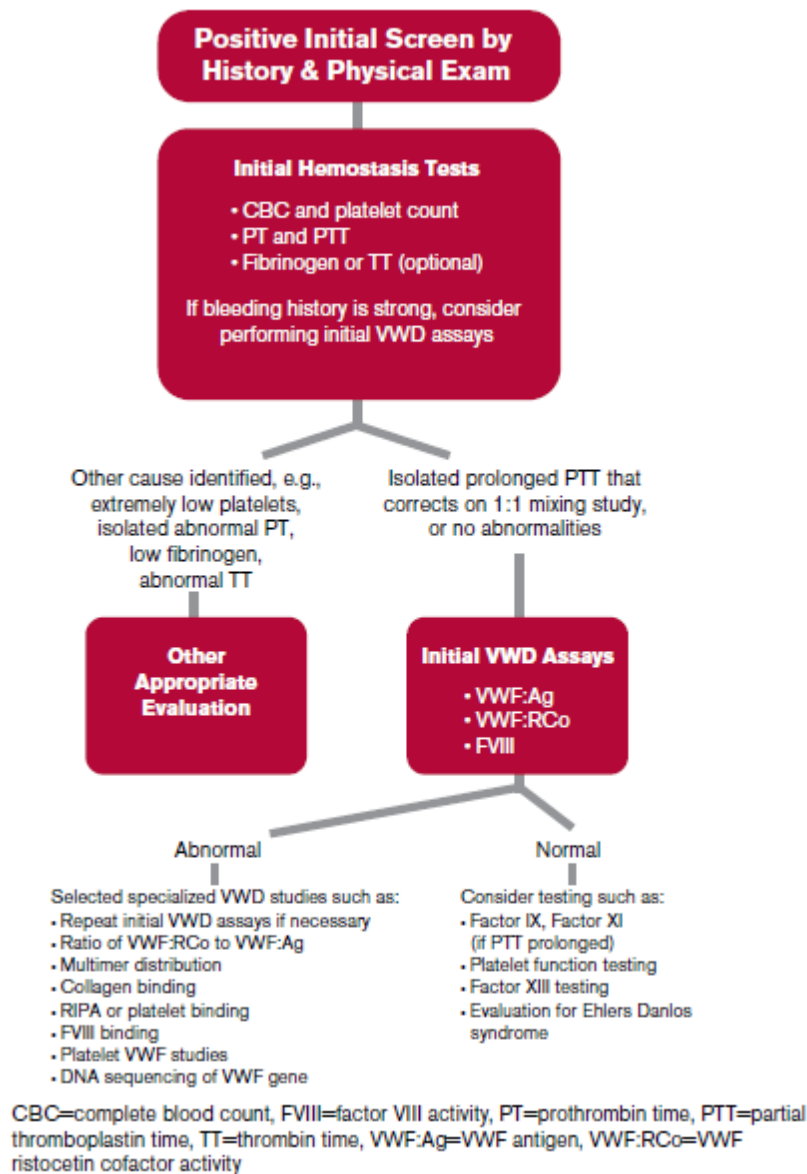
Pourcentage de la cible codante couverte par au moins 30 lectures pour le gène VWF obtenue par exon par échantillon

Gène VWF	Cible génomique	échan1	échan2	échan3	échan4	échan5	échan6	échan7	échan8	échan9	échan10	échan11	échan12	échan13	échan14	échan15	échan16
exon 52	12:6058181-6058369	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 51	12:6058952-6059049	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 50	12:6061010-6061049	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 49	12:6061557-6061685	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 48	12:6062662-6062760	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 47	12:6076652-6076768	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 46	12:6077293-6077333	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 45	12:6078377-6078557	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 44	12:6080765-6080875	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 43	12:6085277-6085426	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 42	12:6090952-6091157	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 41	12:6092316-6092420	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 40	12:6094211-6094285	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 39	12:6094729-6094831	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	100	30	100
exon 38	12:6100985-6101184	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 37	12:6103028-6103369	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 36	12:6103581-6103773	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 35	12:6105168-6105388	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 34	12:6120783-6120960	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 33	12:6121253-6121296	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 32	12:6122647-6122811	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 31	12:6125255-6125398	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 30	12:6125682-6125822	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 29	12:6125920-6126036	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 28	12:6127531-6128909	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 27	12:6131066-6131201	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 26	12:6131906-6132064	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
exon 25	12:6132797-6132953	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 24	12:6134746-6134859	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 23	12:6135072-6135212	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 22	12:6138508-6138654	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 21	12:6140610-6140744	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 20	12:6143854-6143992	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 19	12:6145554-6145657	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 18	12:6153457-6153617	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 17	12:6155889-6155983	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 16	12:6161709-6161949	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 15	12:6166023-6166238	8	9	7	8	10	34	22	25	1	13	15	6	2	25	0	17
exon 14	12:6167015-6167210	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 13	12:6172120-6172220	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 12	12:6173412-6173550	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 11	12:6174303-6174439	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 10	12:6180463-6180509	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 9	12:6181497-6181608	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 8	12:6182785-6182907	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 7	12:6184501-6184717	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 6	12:6204626-6204750	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 5	12:6219540-6219748	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 4	12:6220032-6220134	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 3	12:6230340-6230504	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
exon 2	12:6232308-6232362	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Note : Les exons 15 et 26 ne sont pas couverts par le SNG, ils sont analysés par séquençage de Sanger.

ANNEXE J

Algorithme diagnostique de la maladie de von Willebrand et d'autres désordres de la coagulation



RÉFÉRENCES

- American Society for Hematology (ASH). 2012 clinical practice guideline on the evaluation and management of von Willebrand disease (VWD). Washington, DC : ASH; 2012. Disponible à : <http://www.hematology.org/Clinicians/Guidelines-Quality/Quick-Ref/528.aspx>.
- Armstrong E, Astermark J, Baghaei F, Berntorp E, Brodin E, Clausen N, et al. Nordic hemophilia guidelines. Nordic Hemophilia Council (NHC); 2015. Disponible à : http://www.nordhemophilia.org/library/Files/PDF-skjol/NordicGuidelinesCongenitalHaemophilia_2017.pdf.
- Bastida JM, Gonzalez-Porras JR, Jimenez C, Benito R, Ordonez GR, Alvarez-Roman MT, et al. Application of a molecular diagnostic algorithm for haemophilia A and B using next-generation sequencing of entire F8, F9 and VWF genes. *Thromb Haemost* 2017;117(1):66-74.
- Bastida JM, Del Rey M, Lozano ML, Sarasquete ME, Benito R, Fontecha ME, et al. Design and application of a 23-gene panel by next-generation sequencing for inherited coagulation bleeding disorders. *Haemophilia* 2016;22(4):590-7.
- Borràs N, Batlle J, Perez-Rodriguez A, Lopez-Fernandez MF, Rodriguez-Trillo A, Loures E, et al. Molecular and clinical profile of von Willebrand disease in Spain (PCM-EVW-ES): Comprehensive genetic analysis by next-generation sequencing of 480 patients. *Haematologica* 2017;102(12):2005-14.
- Boylan B, Rice AS, De Staercke C, Eyster ME, Yaish HM, Knoll CM, et al. Evaluation of von Willebrand factor phenotypes and genotypes in Hemophilia A patients with and without identified F8 mutations. *J Thromb Haemost* 2015;13(6):1036-42.
- Duan X, Tang M, Zhang J, Yu H, Xu R. Promising coagulation factor VIII bypassing strategies for patients with haemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25(6):539-52.
- Eckhardt CL, van Velzen AS, Peters M, Astermark J, Brons PP, Castaman G, et al. Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood* 2013;122(11):1954-62.
- Favaloro EJ. Diagnosis or exclusion of von Willebrand disease using laboratory testing. *Methods Mol Biol* 2017;1646:391-402.
- Fidalgo T, Salvado R, Corrales I, Pinto SC, Borràs N, Oliveira A, et al. Genotype-phenotype correlation in a cohort of Portuguese patients comprising the entire spectrum of VWD types: Impact of NGS. *Thromb Haemost* 2016;116(1):17-31.

- Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. Practice guidelines for the molecular diagnosis of haemophilia A. Londres, Angleterre : Clinical Molecular Genetics Society (CMGS), United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO); 2010. Disponible à : http://www.acgs.uk.com/media/774613/haemophilia_a_bpg_revision_sept_2011_approved.pdf.
- Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, et al. The diagnosis and management of von Willebrand disease: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014;167(4):453-65.
- Mazurier C, Goudemand J, Hilbert L, Caron C, Fressinaud E, Meyer D. Type 2N von Willebrand disease: Clinical manifestations, pathophysiology, laboratory diagnosis and molecular biology. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14(2):337-47.
- Oldenburg J et Albert T. Novel products for haemostasis – current status. *Haemophilia* 2014;20(Suppl 4):23-8.
- Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: The FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood* 2016;128(16):2007-16.
- Société canadienne de l'hémophilie (SCH). Qu'est-ce que l'hémophilie ? [site Web]. Montréal, Qc : SCH; 2018. Disponible à : <https://www.hemophilia.ca/fr/quest-ce-que-lhemophilie/> (consulté le 2 novembre 2018).
- Société canadienne de l'hémophilie (SCH). Lignes directrices pour le diagnostic et la prise en charge de la maladie de von Willebrand. Montréal, Qc : SCH; 2012. Disponible à : https://www.hemophilia.ca/wp-content/uploads/2018/08/SCH_VWD_POCKET_GUIDE_FR-final.pdf.
- Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia* 2013;19(1):e1-47.
- World Federation of Hemophilia (WFH). Report on the Annual Global Survey 2015. Montréal, Qc : WFH; 2016. Disponible à : <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1669.pdf>.

ANALYSE DES TRANSLOCATIONS DES SARCOMES DES TISSUS MOUS ET OSSEUX PAR SNG (RÉFÉRENCE – 2018.01.001)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal, Hôpital Maisonneuve – Rosemont

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Le D^r Lambert Busque n'a pas participé aux délibérations et s'est retiré au moment de formuler la recommandation. Le D^r Sébastien Labonté, responsable du secteur de pathologie moléculaire à l'Hôtel-Dieu de Québec, a déclaré travailler sur la migration des tests moléculaires des sarcomes vers le SNG.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation de même que l'exactitude du contenu en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, les experts consultés sont :

- D^r Michel Pavic, hématologue – oncologue au CIUSSS de l'Estrie;
- D^r Sébastien Labonté, anatomopathologiste au CHU de Québec – Université Laval;
- D^r Vincent Castonguay, hématologue – oncologue, CHU de Québec – Université Laval.

2. RÉSUMÉ

	Analyse
Demandeur	CIUSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal, Hôpital Maisonneuve-Rosemont.
Nom et objectif de l'analyse	L'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux sert à confirmer le diagnostic (ou à exclure un diagnostic différentiel), préalablement élaboré à partir des analyses morphologiques, histologiques et immunohistochimiques. Le demandeur propose d'utiliser une technique de SNG avec un enrichissement de gènes ciblés (trousse TruSight ^{MC} RNA Fusion Panel, Illumina ^{MC}).
Situation actuelle	• Les spécimens de sarcomes sont évalués par un pathologiste qui élabore un diagnostic basé sur la morphologie, l'histologie et les analyses en immunohistochimie. • Dans les cas où le diagnostic inclut un sarcome porteur de translocation (~ 33 %), la détection des gènes de fusions oncogéniques se fait principalement par RT-PCR. • Le demandeur propose le remplacement de l'analyse RT-PCR par l'analyse de SNG pour la clientèle desservie par son établissement.
Nombre d'analyses prévues	Le demandeur estime un nombre annuel d'analyses se situant entre 150 et 200.
Valeur diagnostique	L'ensemble des études retenues montrent que les analyses moléculaires sont utiles pour certaines tumeurs dont le phénotype est moins spécifique et qui peuvent soulever plusieurs diagnostics différentiels.
Valeur pronostique/thérapeutique	Aucune étude montrant une influence significative de la présence d'une translocation sur le pronostic des patients n'a été repérée. Les valeurs pronostiques et thérapeutiques de l'analyse proposée sont principalement associées à sa valeur diagnostique puisqu'un manque de précision diagnostique ou une modification du diagnostic à la suite des résultats des analyses moléculaires peut avoir un effet sur le pronostic et les décisions de traitement.
Impact budgétaire	L'impact net annuel d'un premier scénario dans lequel l'analyse par SNG remplacerait les analyses effectuées par RT-PCR pour la clientèle desservie par le centre demandeur et les cas difficilement classifiables suivant la RT-PCR pour l'ensemble du Québec est estimé à 93 665 \$. Un impact net annuel de 219 603 \$ est estimé si l'analyse par SNG est utilisée en remplacement de toutes les analyses par RT-PCR pour l'ensemble du Québec.
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	Plusieurs sociétés savantes (dont le NCCN et l'ESMO) reconnaissent l'utilité des analyses moléculaires en tant que techniques complémentaires pour conforter le diagnostic morphologique pour les sarcomes, surtout lorsque le diagnostic histologique spécifique est douteux, que la présentation clinique est atypique ou lorsque les résultats des analyses moléculaires peuvent procurer une valeur pronostique et/ou prédictive.
Enjeux particuliers	Selon le NCCN et l'ESMO, les résultats des analyses devraient toujours être interprétés selon le contexte clinique et les caractéristiques pathologiques du patient. Les analyses moléculaires peuvent influencer la stratégie de traitement, notamment en apportant une modification du diagnostic.

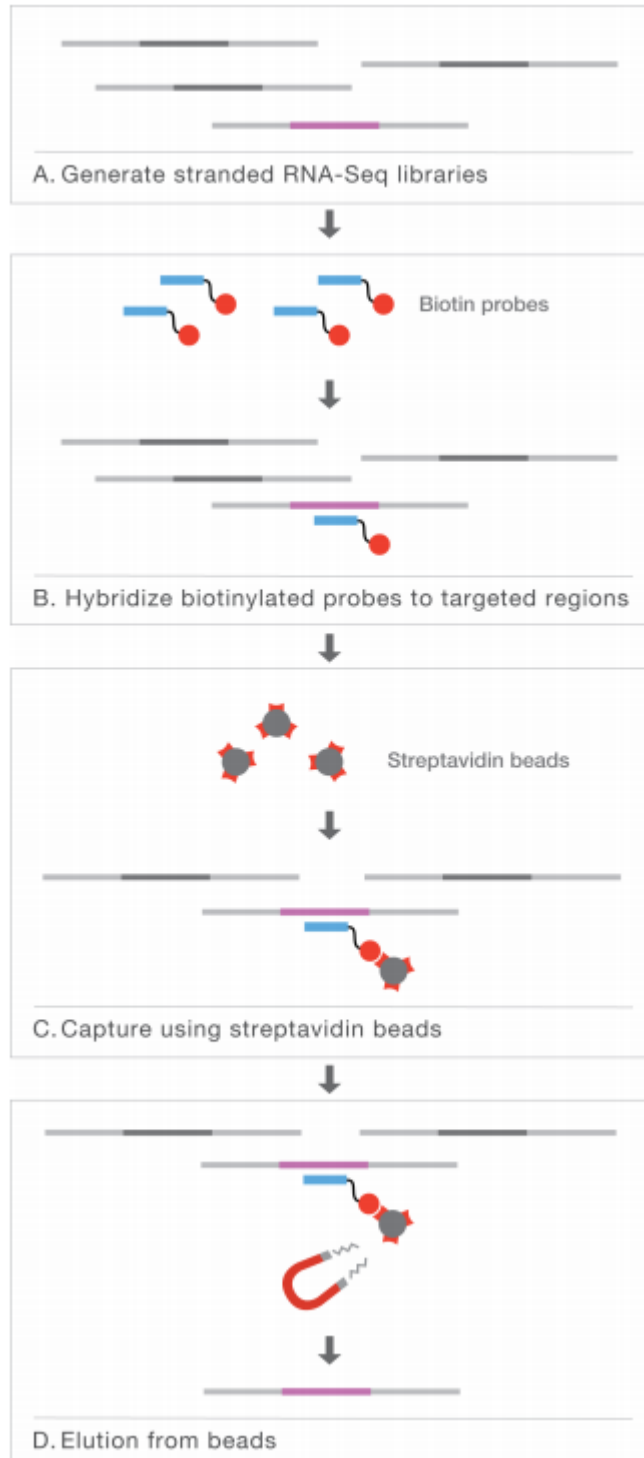
3. ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

3.1. Nom et objectifs de l'analyse

L'analyse des translocations diagnostiques des sarcomes des tissus mous et osseux par la détection des gènes de fusion des sarcomes sert à confirmer le diagnostic (ou à exclure un diagnostic différentiel), préalablement élaboré à partir des analyses histologiques et immunohistochimiques, d'un sarcome des tissus mous ou osseux par une méthode de séquençage de nouvelle génération (SNG) avec un enrichissement des gènes ciblés.

3.2. Description de la méthode

L'analyse des translocations associées aux sarcomes proposée par le demandeur est effectuée à l'aide de la trousse commerciale TruSight^{MC} RNA Fusion Panel de la compagnie Illumina^{MC}. La méthode est basée sur une approche de PCR multiplex sur des librairies d'ADN réalisées à partir de l'ARN provenant d'échantillons de tumeurs fixées au formaldéhyde et enrobées de paraffine (FFPE) ou à partir de tissus (frais ou congelés) (figure 1). Les fragments d'ARN sont convertis en ADN double brin auquel des adaptateurs indexés sont liés à chacune des extrémités. La librairie est amplifiée par PCR et les séquences cibles hybridées à l'aide de sondes spécifiques marquées à la biotine. Deux cycles d'amplification et d'hybridation sont effectués, ce qui permet une meilleure spécificité de l'hybridation. L'ADN complémentaire cible est ensuite capturé par des billes liées à la streptavidine, qui se lient aux sondes biotinées. Cette technique permet d'obtenir une librairie d'ADN enrichie pour les gènes de fusion impliquant les gènes sélectionnés. La librairie ainsi obtenue est alors séquencée et analysée pour la présence de gènes de fusion à l'aide de logiciels. La trousse comporte un panel de 507 fusions de gènes associées à différents cancers.



Source : Feuille de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel (Illumina) disponible à : <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf> (consulté le 16 juillet 2018).

Figure 1 Capture de gènes ciblés par la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel

3.3. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Les spécimens, des blocs de tissus frais ou paraffinés provenant de biopsies ou d'excisions chirurgicales, seront envoyés dans un premier temps au laboratoire de pathologie de l'installation Maisonneuve-Rosemont. Après l'identification de tissu tumoral adéquat, les coupes du bloc seront acheminées au laboratoire de diagnostic moléculaire pour les analyses moléculaires et bio-informatiques.

L'algorithme de traitement des échantillons cliniques proposé par le demandeur est présenté à l'annexe A.

3.4. Société ou concepteur

Le demandeur propose d'utiliser la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel de la compagnie Illumina^{MC}.

Il existe deux trousse commerciales non homologuées ciblant spécifiquement les translocations associées à des sarcomes des tissus mous et osseux. Chacune de ces trousse ne cible que 26 gènes (différents gènes sont ciblés selon la trousse utilisée) :

- Archer FusionPlex^{MC} Sarcoma Panel (ArcherDX)
- Sarcoma Comprehensive Panel^{MC} (Fulgent)

3.5. Homologation

Cette analyse n'a fait l'objet d'aucune homologation par Santé Canada ou la Food and Drug Administration (FDA).

3.6. Valeur pondérée : 852,65

4. CONTEXTE

4.1. Patients ciblés

Les patients qui ont reçu un diagnostic de sarcome, posé à la suite d'une étude histologique conventionnelle, dont le sous-type est connu pour être associé à une translocation spécifique, afin de confirmer le diagnostic ou d'exclure un diagnostic différentiel.

4.2. Description de la maladie visée

Les sarcomes représentent un groupe hétérogène de tumeurs d'origine mésenchymale de différentes étiologies, formé de plus de 100 sous-types histologiques [Grisberg *et al.*, 2017]. Les sarcomes des tissus mous se forment dans les muscles, les articulations, le tissu adipeux, les nerfs, les tissus profonds de la peau et les vaisseaux sanguins [Burningham *et al.*, 2012]. Les tumeurs malignes osseuses, telles que les ostéosarcomes et le sarcome d'Ewing, se forment dans les os et le cartilage [Burningham *et al.*, 2012]. En 2013¹⁰, 1 255 Canadiens ont reçu un diagnostic de sarcome des tissus mous et 765 décès associés à ces cancers sont survenus. Les sarcomes des tissus mous représentent le cinquième groupe de

¹⁰ Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques sur le sarcome des tissus mous [site Web], <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/soft-tissue-sarcoma/statistics/?region=qc> (consulté le 13 juillet 2018).

cancers le plus souvent diagnostiqué chez les enfants, avec une incidence de 6 % au Canada¹¹ [Ellison et Janz, 2015].

Les sarcomes peuvent être classés en deux catégories : les sarcomes à caryotype complexe et ceux à caryotype simple. Les sarcomes à caryotype complexe présentent des anomalies génétiques multiples (par exemple de multiples translocations chromosomiques, des mutations, des amplifications et des délétions) et sont souvent aneuploïdes, contrairement aux sarcomes à caryotype simple qui comportent une ou quelques anomalies chromosomiques pathogéniques caractéristiques (telles que des mutations, des amplifications géniques ou des translocations de gènes) [Van de Rijn *et al.*, 2014; Lahat *et al.*, 2008]. Le premier groupe montre souvent un phénotype histologique hautement agressif observé, entre autres, dans les sarcomes pléomorphes indifférenciés, les liposarcomes pléomorphes et les léiomyosarcomes [Van de Rijn *et al.*, 2014]. Grâce aux avancements technologiques en cytogénétique, un nombre important de translocations chromosomiques caractéristiques de sarcomes ont été décelées [Xiao *et al.*, 2018]. Les sarcomes associés aux translocations constituent un sous-type classique avec une nosologie distincte [Dufresne *et al.*, 2018]. Les principaux gènes de fusion résultant des translocations associées aux sarcomes sont présentés en détail à l'annexe B.

Malgré leurs caractéristiques biologiques et histologiques variées, le traitement des sarcomes non métastatiques demeure similaire et consiste généralement en une combinaison de chirurgie et de radiothérapie quelquefois accompagnées d'une chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante¹² [Grisberg *et al.*, 2017]. Néanmoins, malgré un traitement local ou régional adéquat, jusqu'à 40 % des patients développeront des métastases. Le principal traitement des tumeurs avancées est la chimiothérapie [Lucchesi *et al.*, 2018]. La survie globale médiane des patients présentant un sarcome des tissus mous métastatique est de 14 mois. Elle a augmenté de 50 % dans les 20 dernières années [Italiano *et al.*, 2011]. La survie relative après 5 ans, pour l'ensemble des sarcomes des tissus mous, est de 65 % au Canada¹³.

¹¹ Entre les années 2006 et 2010.

¹² L'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing et le rhabdomyosarcome sont des tumeurs qui nécessitent presque toujours un traitement de chimiothérapie adjoint au traitement local de la tumeur (communication de Dr Castonguay, hématologue-oncologue, CHU de Québec, 12 septembre 2018).

¹³ Société canadienne du cancer (SCC). Statistiques de survie pour le sarcome des tissus mous [site Web], disponible à : <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/soft-tissue-sarcoma/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=qc> (consulté le 13 juillet 2018).

4.3. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le demandeur estime que le nombre d'analyses prévues se situe entre 150 et 200 par année au Québec.

4.4. Situation actuelle

En présence d'un cas présumé de sarcome des tissus mous ou osseux, un échantillon de tissu, provenant d'une biopsie ou d'une résection chirurgicale, est envoyé au pathologiste qui procède à l'examen morphologique du bloc et à une coloration à l'hématoxyline éosine d'une coupe. Le pathologiste évalue le contenu en cellules tumorales et choisit une section à analyser par immunohistochimie¹⁴.

Dans le cas où le sarcome du diagnostic initial primaire ou différentiel (basé sur l'examen histologique et les analyses immunohistochimiques) est connu comme étant porteur d'une translocation spécifique, une analyse pour la détection de la translocation soupçonnée est demandée pour confirmer le diagnostic ou écarter un diagnostic différentiel. Présentement, la détection des translocations se fait par RT-PCR (de l'anglais *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) et couvre les principales translocations de 10 sous-types de sarcomes (voir la section 4.5). La recherche de certaines translocations avec des sites de cassures multiples (ex. *EWSR1-FL1*) se fait par RT-PCR multiplex, de manière à capter tous les sites de coupures. Cette approche permet d'ailleurs de couvrir environ 90 % des translocations du sarcome d'Ewing¹⁵. Environ 90 % à 95 % des cas de sarcomes porteurs de translocations sont présentement couverts en situation clinique.

¹⁴ Information fournie par Dr Sébastien Labonté, anatomo-pathologiste, CHU de Québec – Université Laval.

¹⁵ Information fournie par Madame Chantal Courtemanche, responsable de l'Unité d'interface (CHU de Québec, Centre de recherche clinique et évaluative en oncologie, CRCEO).

Tableau 1 Incidence de différents sous-types de sarcomes des tissus mous et osseux

SOUS-TYPE DE SARCOME	INCIDENCE RAPPORTÉE (par 100 000)	NOMBRE DE CAS ANNUELS ESTIMÉS AU QUÉBEC*
SOUS-TYPES DE SARCOMES ACTUELLEMENT COUVERTS AU QUÉBEC†		
Sarcome alvéolaire des parties molles	0,01	1
Sarcome à cellules claires	0,01	1
Sarcome fibromyxoïde de bas grade / Fibrosarcome épithélioïde sclérosant	0,09	7
Sarcome d'Ewing	0,08	7
Rhabdomyosarcome alvéolaire	0,05	4
Sarcome synovial	0,13	11
Liposarcome myxoïde	0,09	11
Dermatofibrosarcome‡	0,36	30
SOUS-TYPES DE SARCOMES ACTUELLEMENT NON COUVERTS AU QUÉBEC		
Hémangioendothéliome épithélioïde	0,01	1
Sarcome stromal endométrial	0,12	10
Tumeur fibreuse solitaire§	0,04	3
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	0,01	1
PEComa	0,01	1

Adapté de Mastrangelo *et al.*, 2012 et Ducimetière *et al.*, 2011.

* Estimation du demandeur

† Le fibrosarcome congénital de même que le chondrosarcome myxoïde sont également couverts au Québec. Le demandeur estime à un par année le nombre de cas de ces tumeurs au Québec.

‡ Le dermatofibrosarcome est une tumeur qui ne nécessite pas de confirmation moléculaire dans la majorité des cas. Les analyses moléculaires peuvent être utiles dans certains cas ambigus (communication avec Dr Sébastien Labonté, anatomo-pathologiste, CHU de Québec, 12 septembre 2018).

§ La tumeur fibreuse solitaire est une tumeur qui ne nécessite pas d'analyse moléculaire dans la majorité des cas. L'analyse de STAT6 en immunohistochimie permet de détecter la fusion NAB2-STAT6 avec une bonne fiabilité (communication avec Dr Sébastien Labonté, 12 septembre 2018).

4.5. Données médico administratives

La détection de translocations associées aux sarcomes des tissus mous et osseux par SNG n'est pas inscrite dans le *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*.

Le tableau 2 présente les données de volumétrie concernant les analyses de translocations pour différents sous-types de sarcomes présentement offertes par RT-PCR.

Tableau 2 Volumétrie des analyses en lien avec la recherche de translocations dans les sarcomes des tissus mous et osseux pour les années 2015-2016, 2016-2017 et 2017-2018

ANALYSE	2015 - 2016		2016 - 2017		2017 - 2018	
	NOMBRE	COÛT TOTAL (\$)	NOMBRE	COÛT TOTAL (\$)	NOMBRE	COÛT TOTAL (\$)
60155 / 65014 Chondrosarcome myxoïde (EWSR1-TEC de la t(9;22), TAF2N-TEC de la t(9;17) (TAAN sur tissus)	5	1 400	4	1 120	5	1 400
60156 / 65030 Dermato-fibrosarcome (COL1A1-PDGFB de la t(17;22) (TAAN sur tissus)	13	3 172	12	2 928	15	3 660
21102 / 65040 Fibrosarcome congénital t(12;15) (TAAN)	0	0	0	0	1	155
60173 / 65130 Liposarcome myxoïde (FUS-CHOP de la t(12;16), EWSR1-CHOP de la t(12;22)) (TAAN) sur tissus	9	2 520	8	2 240	4	1 120
21095 / 65162 Rhabdomyosarcome alvéolaire t(1;13) t(2;13) (TAAN)	10	1 850	9	1 665	9	1 665
60183 / 65164 Sarcome à cellules claires ou histiocytome fibreux angiomatoïde (FUS-ATF1 de la t(12;16), EWSR1-CREB1 de la t(12;22), EWSR1-CREB1 de la t(2;22)) (TAAN)	9	2 880	20	6 400	27	8 640
60184 / 65166 Sarcome alvéolaire des tissus mous (ASPL-TFE3 de la t(X;17) (TAAN)	1	244	1	244	0	0
21096 / 65168 Sarcome Ewing <i>EWS/FL1</i> t(11;22) et <i>EWS/ERG</i> t(21;22)	28	5 096	24	4 368	31	5 642
60185 / 65170 Sarcome fibromyxoïde de bas grade (FUS-CREB3L2 de la t(7;16), FUS-CREB3L1 de la t(11;16)) (TAAN)	18	5 400	6	1 800	9	2 700
21101 / 65172 Sarcome synovial t(x;18)	43	7 955	41	7 585	43	7 955
TOTAL	136	30 517	125	28 350	135	32 937

Source : Données du ministère de la Santé et des Services sociaux.

4.6. Brève description des avantages allégués de l'analyse proposée

Selon le demandeur, cette nouvelle analyse a le potentiel d'améliorer l'investigation moléculaire des sarcomes, en permettant des diagnostics plus précis, plus rapides et pour un plus grand nombre de cas. Cela pourrait permettre d'améliorer la prise en charge de ces cancers complexes et potentiellement guérissables.

Le diagnostic des sarcomes associés à des translocations se fait par une analyse histologique qui peut être complémentée d'analyses immunohistochimiques, de FISH (de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*) et de RT-PCR. Les avantages de la technique de SNG proposée sont :

- de permettre un traitement adapté à la pathologie du patient;
- la possibilité d'identifier les gènes de fusion à une résolution nucléotidique;
- de détecter dans une seule analyse la présence d'une multitude de translocations différentes, variables et rares;
- la méthode peut avoir un meilleur rapport coût-efficacité que le FISH, par exemple, qui nécessite des sondes spécifiques pour chaque partenaire de fusion qui peuvent être rares dans certains cas;
- de permettre de réduire les délais en comparaison de l'approche de FISH qui est quelques fois complémentée, de manière séquentielle, par la RT-PCR pour l'identification du gène partenaire (implique des fusions choisies, testées et validées);
- de permettre de simplifier la gestion des échantillons entre les laboratoires impliqués;
- de permettre de remplir un besoin clinique qui n'est pas couvert actuellement (l'analyse par RT-PCR n'est pas offerte pour plusieurs translocations diagnostiques moins communes);
- de permettre une meilleure précision diagnostique puisque l'essai peut détecter les fusions même lorsque la séquence de fusion varie, alors que la RT-PCR est très sensible à la séquence de liaison des amorces.

4.7. Assurance qualité

De nombreux points de contrôles, à diverses étapes de l'analyse, ont été instaurés par le demandeur pour cette technique :

Qualité de l'ARN : La qualité de l'ARN isolé des échantillons sera évaluée à l'aide d'une puce (Bioanalyzer RNA nano^{MC}, Agilent) pour quantifier l'ARN total en fonction de sa taille et en déterminer sa qualité (facteur DV₂₀₀).

Qualité de la librairie : Des biopuces (Bioanalyzer DNA^{MC} 1 000) seront utilisées afin de quantifier et d'évaluer la taille des fragments d'ADN de la librairie. La taille de la majorité des fragments doit se situer autour de 250 à 300 nucléotides avant l'étape de l'hybridation des sondes. Une reprise de la librairie est prévue si la concentration d'ADN est inférieure à 20 ng/μl pour les fragments d'une taille de 160 à 170 nucléotides. Une deuxième évaluation de la qualité de la librairie est prévue lorsque la librairie finale est générée. Advenant une concentration d'ADN de la librairie inférieure à 20 ng/μl pour les fragments entre 200 et 1 000 nucléotides, une nouvelle librairie sera générée pour cet échantillon.

Qualité des séquences obtenues : Les séquences obtenues devront démontrer un Q-score ≥ 30 (signifiant que la probabilité d'une base incorrecte est inférieure à 1/1 000).

Qualité des résultats obtenus : Des données de validation locales ont montré qu'un nombre de lectures de 2 millions par le logiciel *Local Run Manager* (RNA Fusion Module, Illumina^{MC}) est suffisant pour obtenir un résultat fiable. Cependant, tous les résultats positifs pour une fusion seront considérés si le nombre de lectures est de 1,5 million ou plus puisque les fusions seront validées par une technique moléculaire alternative. De plus, un deuxième logiciel de détection des fusions (JAFFA) sera utilisé. La qualité des résultats sera vérifiée par l'analyse de 15 gènes *pseudo-housekeeping*¹⁶ couverts par le panel de gènes TruSight^{MC} RNA Fusion. Les résultats seront confirmés par une analyse manuelle des séquences de fusion avec le logiciel d'alignement BLAST. La pertinence des séquences de fusion détectées sera vérifiée dans différentes bases de données de fusions associées aux différents types de sarcomes.

Contrôle de qualité par une méthode alternative : Pendant une période d'un an, qui correspond à la période de validation prévue, le laboratoire demandeur procédera à une confirmation des fusions détectées par RT-PCR. Dans un souci de protection du patient et dans un contexte où la limite de détection est difficilement évaluable, le demandeur s'engage, sur l'ensemble de la période de validation et de mise en place de la technique, à transférer les échantillons, pour lesquels aucune fusion n'aura été détectée, vers les laboratoires externes, comme c'est le cas actuellement.

Contrôle de qualité externe : Un contrôle de qualité externe pour l'étude des translocations génétiques dans les cas de sarcomes est possible via le service *United Kingdom National External Quality Assessment Services* (UK NEQAS) nommé : *Sarcoma testing by RT-PCR and FISH*.

De plus, le demandeur propose de participer à l'échange d'échantillons anonymisés annuellement avec le centre canadien spécialisé en sarcomes *Sarcoma Unit* (Mont Sinai Hospital, Toronto).

5. DONNÉES PUBLIÉES

Dans le cadre de cette évaluation, 12 études comportant des données liées à la détection de translocations associées aux sarcomes des tissus mous et osseux et à leur influence sur le diagnostic, le pronostic ou la prise en charge, ont été retenues [Cote *et al.*, 2018; Lucchesi *et al.*, 2018; Watson *et al.*, 2018; Harttrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2016; Italiano *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015; Neuville *et al.*, 2013]. Les caractéristiques de ces études sont présentées à l'annexe D.

5.1. Corrections et précisions diagnostiques résultant de la recherche de translocations dans les sarcomes des tissus mous et osseux

Deux études prospectives retenues [Italiano *et al.*, 2016; Neuville *et al.*, 2013] avaient pour objectif, entre autres, d'évaluer l'impact diagnostique des analyses moléculaires des sarcomes. L'étude d'Italiano et ses collaborateurs [2016] comptait

¹⁶ Ces gènes ont été sélectionnés pour leur niveau stable d'expression élevée, peu importe le type de sarcome.

384 patients ayant reçu un diagnostic de sarcome des tissus mous ou osseux, alors que l'étude de Neuville et ses collaborateurs [2013] comptait 1 484 tumeurs de tissus mous et viscéraux primaires, dont 286 cas présumés de translocations. Pour ces deux études, le diagnostic primaire des tumeurs posé par un pathologiste spécialisé en sarcomes, basé sur le contexte clinique et l'examen histologique, et stratifié selon le niveau de confiance du diagnostic (certain, probable ou possible), a été révisé suite à l'obtention des résultats des analyses moléculaires.

Pour l'étude d'Italiano [2016], une modification du diagnostic, suite aux analyses moléculaires, a été apportée à 53 de 384 patients (13,8 %). Quarante-neuf de ces 53 patients avaient un diagnostic de sarcome associé à des translocations. Les résultats de confirmation du diagnostic prémoléculaire stratifié selon le niveau de confiance sont présentés dans le tableau 3. Le diagnostic moléculaire a confirmé 94 % des diagnostics jugés certains et 71 % des diagnostics probables. Dans le cas de l'étude de Neuville [2013], les analyses moléculaires de sarcomes soupçonnés de translocations ont permis de confirmer un diagnostic jugé certain ou probable dans 86 % et 83 % des cas, respectivement. Toutefois, le diagnostic initial posé avec un faible niveau de confiance (possible) a été écarté dans 77 % des cas (tableau 3).

Les révisions diagnostiques de l'étude d'Italiano [2016] ont influencé le plan de traitement de 41 patients sur 49 (83,6 %) et le pronostic de 38 patients sur 49 (77,5 %). En somme, les données d'Italiano [2016] et de Neuville [2013] montrent que le diagnostic basé uniquement sur la morphologie peut être trompeur dans environ 20 % des cas de sarcomes. De plus, la révision du diagnostic peut entraîner des conséquences sur le pronostic et la prise en charge des patients [Italiano *et al.*, 2016].

Tableau 3 Capacité des analyses moléculaires à confirmer le diagnostic initial stratifié selon le niveau de confiance, pour les translocations associées aux sarcomes

NIVEAU DE CONFIANCE DU DIAGNOSTIC	RÉSULTATS DES ANALYSES MOLÉCULAIRES				
	Italiano <i>et al.</i> , 2016		Neuville <i>et al.</i> , 2013		
	POSITIFS	NÉGATIFS	POSITIFS	NÉGATIFS	NON INTERPRÉTABLES
CERTAIN	157/166 (94 %)	9/166 (5 %)	72/84 (86 %)	3/84 (3 %)	9/84 (11 %)
PROBABLE	91/129 (71 %)	38/129 (29 %)	62/75 (83 %)	12/75 (16 %)	1/75 (1 %)
POSSIBLE	20/89 (22 %)	69/89 (78 %)	19/89 (21 %)	68/89 (77 %)	2/89 (2 %)

Plusieurs exemples de diagnostics révisés, suite à la détection de translocations par des analyses moléculaires dans les sarcomes, ont été repérés dans la littérature et sont présentés dans le tableau 4. Les études retenues ont utilisé des approches de SNG, à l'exception de l'étude d'Italiano et ses collaborateurs [2016], laquelle a plutôt eu recours à la RT-PCR et au FISH.

Tableau 4 Révisions diagnostiques résultant de la recherche de translocations de sarcomes

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
Italiano <i>et al.</i> , 2016 [†] (384)	Lésion réactionnelle (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2) Histiocytofibrome bénin (3)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Sarcome de bas grade non classé (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2) Tumeur solitaire fibreuse (3)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Périneuriome (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Tumeur de la famille des sarcomes d'Ewing (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome à cellules rondes
	Dermatofibrosarcome protuberans (1) Tumeur solitaire fibreuse (2)	Tumeur solitaire fibreuse
	Fibrosarcome (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Tumeur stromale génitale bénigne (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Sarcome synovial (1) Sarcome à petites cellules non classé (2)	Sarcome non classé
	Liposarcome à cellules myxoïdes/rondes (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome à cellules fusiformes non classé
	Léiomyosarcome (1) Liposarcome indifférencié (2)	Liposarcome indifférencié
	Myxofibrosarcome de bas grade (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Sarcome à cellules fusiformes/myxoïdes (1) Dermatofibrosarcome protuberans (2) Chondrosarcome myxoïde (3)	Dermatofibrosarcome protuberans
	Léiomyosarcome pléomorphe (1) Liposarcome indifférencié (2)	Liposarcome indifférencié
	Léiomyosarcome (1) Liposarcome indifférencié (2)	Liposarcome indifférencié
	Rhabdomyosarcome alvéolaire (1) Rhabdomyosarcome embryonnaire (2)	Rhabdomyosarcome embryonnaire
	Sarcome non classé (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome synovial
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2)	Sarcome indifférencié à petites cellules rondes
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Chondrosarcome (2) Sarcome synovial (3) Sarcome indifférencié (4)	Sarcome indifférencié
	Rhabdomyosarcome embryonnaire (1) Rhabdomyosarcome alvéolaire (2)	Rhabdomyosarcome alvéolaire

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
	Lymphome non hodgkinien (1) Leucémie (2) Rhabdomyosarcome (3)	Rhabdomyosarcome alvéolaire
	Sarcome synovial (1) Carcinosarcome (2)	Carcinosarcome
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2) Lymphome (3)	Tumeur maligne non différenciée
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2) Lymphome (3)	Tumeur maligne non différenciée
	Sarcome synovial (1) Sarcome indifférencié (2)	Tumeur de la gaine des nerfs périphériques
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Tumeur rhabdoïde (2) Tumeur desmoplastique (3)	Sarcome indifférencié à petites cellules rondes
	Sarcome synovial (1) Carcinome sarcomatoïde (2)	Carcinome sarcomatoïde
	Schwannome (1) Tumeur de la gaine des nerfs périphériques (2) Rhabdomyosarcome alvéolaire (3) Rhabdomyosarcome embryonnaire (4)	Rhabdomyosarcome sclérosant
	Sarcome à cellules fusiformes (1) Tumeur de la gaine des nerfs périphériques (2) Sarcome synovial (3)	Tumeur de la gaine des nerfs périphériques
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Carcinome neuroendocrine (2)	Carcinome neuroendocrine indifférencié
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome indifférencié à petites cellules rondes (2)	Sarcome indifférencié à petites cellules rondes
	Sarcome synovial (1) Tumeur solitaire fibreuse (2)	Tumeur solitaire fibreuse
	Sarcome à cellules rondes et fusiformes (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2)	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing
	Blastome pleuro pulmonaire (1) Mésenchymome (2) Rhabdomyosarcome embryonnaire (3)	Tumeur maligne mésenchymateuse avec composante rhabdomyosarcomatique
	Rhabdomyosarcome embryonnaire (1) Rhabdomyosarcome alvéolaire (2)	Rhabdomyosarcome alvéolaire
	Rhabdomyosarcome embryonnaire (1) Rhabdomyosarcome alvéolaire (2)	Rhabdomyosarcome alvéolaire
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2) Sarcome non classé (3)	Sarcome non classé
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2) Sarcome non classé (3)	Tumeur solitaire fibreuse
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome synovial (2) Sarcome à cellules claires (3)	Sarcome synovial
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Sarcome à petites cellules (2)	Tumeur mésenchymateuse maligne à cellules rondes

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
	Sarcome à cellules claires (3)	
	Sarcome synovial	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing	Sarcome à cellules rondes (fusion <i>BCOR-CCNB3</i>)
	Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (1) Ostéosarcome à petites cellules (2)	Ostéosarcome de haut grade
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2)	Rhabdomyosarcome à cellules fusiformes
	Sarcome synovial (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2) Autre sarcome (3)	Méningiome métastatique
	Sarcome synovial (1) Autre sarcome (2)	Tumeur à petites cellules
	Sarcome synovial (1) Sarcome non classé (2)	Sarcome prostatique à cellules fusiformes
	Sarcome synovial (1) Ostéosarcome (2) Sarcome non classé (3)	Tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques
	Liposarcome à cellules myxoïdes/rondes (1) Tumeur de la famille du sarcome d'Ewing (2)	Sarcome indifférencié à cellules rondes
Harris <i>et al.</i> , 2016 (89)	Sarcome d'Ewing	Sarcome myxoïde pulmonaire primaire (<i>EWSR1-CREB1</i>)
	Mélanome malin de stade III	Sarcome cutané à cellules claires (<i>EWSR1-ATF1</i>)
Watson <i>et al.</i> , 2018 (94)	Sarcome à petites cellules rondes non classé	Péricytome (<i>ACTB-GLI1</i>)
	Sarcome à petites cellules rondes non classé	Carcinome de type NUT (<i>BRD3-NUTM1</i>)
	Tumeur solitaire fibreuse	Dermatofibrosarcome protuberans (<i>COL1A1-PDGFB</i>)
	Sarcome fibromyxoïde de bas grade	Myoépithéliome (<i>EWSR1-PBX1</i>)
	Tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques	Sarcome sinonasal (<i>PAX3-MAML3</i>)
Cote <i>et al.</i> , 2018 (133)	Tumeur de glande salivaire	Sarcome d'Ewing (<i>EWSR1-FL1</i>)
	Angiosarcome épithélioïde de haut grade	Hémangioendothéliome épithélioïde (<i>WWTR1-CAMTA</i>)
Chang <i>et al.</i> , 2016 (59)	Sarcome d'Ewing	Tumeur similaire au sarcome d'Ewing (<i>CIC-FOXO4</i>)
	Histiocytome fibreux de haut grade	Sarcome non différencié (absence de fusion)
	Sarcome de cellules claires du rein	Sarcome non différencié (<i>BCOR-CCNB3</i>)
Mody <i>et al.</i> , 2015 (91)	Myofibromatose infantile	Fibrosarcome infantile (<i>LMNA-NTRK1</i>)
	Médulloblastome	Rhabdomyosarcome (<i>PAX3-NCOA2</i>)

ÉTUDE (N)	DIAGNOSTIC INITIAL	DIAGNOSTIC RÉVISÉ (FUSION)*
Oberg <i>et al.</i> , 2016 (101)	Sarcome indifférencié	Fibrosarcome infantile (EML4-NTRK3)

* Dans plusieurs cas, la fusion spécifique n'a pas été précisée dans l'étude d'Italiano et ses collaborateurs [2016].

† Parmi les 53 diagnostics révisés suite à des analyses moléculaires, 49 étaient associés à la recherche de translocations.

L'importance diagnostique clinique liée à la détection des translocations associées aux sarcomes a été mise en évidence par plusieurs études [Cote *et al.*, 2018; Watson *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2016; Italiano *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015; Neuville *et al.*, 2013]. Les résultats de ces travaux montrent que les analyses moléculaires sont utiles pour certaines tumeurs dont le phénotype immunologique est moins spécifique et qui peuvent soulever plusieurs diagnostics différentiels. Elles doivent toutefois être interprétées dans leur contexte clinique et histologique puisque la même translocation peut être présente dans différentes tumeurs [Neuville *et al.*, 2013].

5.2. Utilité de l'identification de transcrits de fusions pour le diagnostic de sarcomes dans les cas de diagnostics pathologiques imprécis

Watson et ses collaborateurs [2018] ont évalué l'efficacité du séquençage du transcriptome à classer les sarcomes atypiques, les sarcomes pour lesquels aucune aberration génétique pathogénique n'a été détectée, ou les cas présumés de sarcomes. Dans ce contexte, un gène de fusion a été détecté dans 55 des 94 échantillons analysés. 26 des 55 échantillons positifs exprimaient un gène de fusion rapporté de manière récurrente dans la littérature ou un transcrit de fusion émergent qui n'était pas inclus dans la procédure standard de RT-PCR utilisée. Cette étude a permis d'identifier des transcrits de fusions associées aux sarcomes pour 26 de 94 échantillons provenant de patients au diagnostic pathologique imprécis.

5.3. Transcrits de fusions comme cibles thérapeutiques potentielles dans les sarcomes des tissus mous et osseux

Bien que l'utilité de la détection de translocations dans les sarcomes soit principalement liée au diagnostic, la recherche documentaire a repéré huit études qui ont procédé au profilage de tumeurs dans le but de déceler des anomalies actionnables (de l'anglais *actionable alteration*)¹⁷ qui pourraient être utilisées pour guider un traitement personnalisé des patients [Cote *et al.*, 2018; Lucchesi *et al.*, 2018; Harttrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015].

Sept études visaient des patients présentant des tumeurs avancées, métastatiques, récurrentes, réfractaires ou non résécables, pour qui les options de traitement étaient limitées [Cote *et al.*, 2018; Harttrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2016; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015]. Seules deux études ne portaient que sur les sarcomes [Cote *et al.*, 2018; Lucchesi *et al.*, 2018]. Quoique peu de translocations actionnables aient été décelées (11 sur un total de

¹⁷ Une définition des anomalies moléculaires actionnables pour les études est présentée à l'annexe C.

302 sarcomes¹⁸ pour les huit études), des fusions actionnables pour les sarcomes ont été rapportées dans chacune des études, à l'exception de celle de Cote et ses collaborateurs [2018] (annexe E).

5.4. Valeur pronostique

Le pronostic est étroitement lié au diagnostic des différents sous-types de sarcomes des tissus mous et osseux. Par conséquent, la détection d'une translocation aboutissant à une modification du diagnostic peut influencer le pronostic du patient (section 5.1).

Néanmoins, cinq études, dont une revue systématique avec méta-analyse, portant sur la valeur pronostique de translocations spécifiques à certains sous-types de sarcomes ont été repérées [Bianchi *et al.*, 2017; Stegmaier *et al.*, 2017; Kubo *et al.*, 2015; Le Deley *et al.*, 2010; Van Doorninck *et al.*, 2010]. Toutefois, aucune d'entre elles ne montrait une influence significative de la présence d'une translocation sur le pronostic des patients.

La revue systématique avec méta-analyse retenue a analysé la valeur pronostique des translocations *PAX3-FOXO1* ou *PAX7-FOXO1* dans le rhabdomyosarcome alvéolaire [Kubo *et al.*, 2015]. La méta-analyse comprenait au total 993 patients provenant de 7 études. Parmi ces études, 3 montraient qu'il n'y a pas de différence significative de la survie entre les patients ayant un rhabdomyosarcome alvéolaire avec ou sans fusion. Le rapport des risques instantanés groupé de quatre études indiquait une probabilité de survie réduite des patients présentant une fusion *PAX3-FOXO1* comparativement à celle des patients présentant une fusion *PAX7-FOXO1*, bien que cette différence n'était pas significative ($p = 0,07$).

Bianchi et ses collaborateurs [2017] ont évalué l'influence des caractéristiques histologiques et moléculaires sur le pronostic de la maladie dans une cohorte rétrospective de 196 patients atteints de sarcome synovial des extrémités. Aucune corrélation n'a été observée entre le type de fusion, *SS18-SSX1* ou *SS18-SSX2*, et la survie. De même, aucune différence significative du statut de fusion *SYT-SSX* sur la survie globale ou la survie sans événement n'a été observée dans une cohorte de 74 patients¹⁹ ayant reçu un diagnostic de sarcome synovial²⁰ [Stegmaier *et al.*, 2017].

L'influence de la structure des transcrits de fusion sur la progression et la récurrence de tumeurs de la famille du sarcome d'Ewing a été évaluée dans une cohorte de 565 patients recrutés dans l'étude clinique du *European Ewing Tumor Working Initiative of National Groups* (Euro-E.W.I.N.G 99) [Le Deley *et al.*, 2010]. Aucune différence significative de la valeur pronostique (risque de progression ou de récurrence) n'a été observée entre les différents transcrits de fusions. Selon Van Doorninck et ses collaborateurs [2010], les protocoles de traitement standards à cinq agents qui combinent l'ifosfamide et l'étoposide à la chimiothérapie à trois agents (vincristine, doxorubicine et cyclophosphamide) ont permis d'améliorer drastiquement la situation des patients atteints d'une tumeur non de type 1 qui avait préalablement été associée à un moins bon pronostic [Riley *et al.*, 2003].

¹⁸ Parmi les 1 151 patients, seulement 142 avaient une tumeur de type sarcome ou sarcome associé aux translocations.

¹⁹ Cette cohorte était principalement formée d'enfants et d'adolescents.

²⁰ En analyse univariée et multivariée du modèle de régression de Cox.

5.5. Valeur thérapeutique

Des évidences de pertinence clinique de l'analyse des translocations dans la détermination de traitements ciblés des sarcomes ont été présentées à la section 5.1.

5.6. Validité analytique

Comparaison de l'approche par SNG de gènes ciblés aux techniques de FISH et de RT-PCR

Dans une étude visant à évaluer l'applicabilité d'une approche de SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex (de l'anglais *AMP-based targeted NGS*) pour la détection de fusions dans les tumeurs osseuses et des tissus mous, Lam et ses collaborateurs [2018] ont comparé les résultats obtenus par SNG à ceux obtenus par FISH conventionnel, par RT-PCR et par immunohistochimie (lorsque possible).

Dans 3 des 48 cas pour lesquels une fusion a été détectée par l'approche de SNG ciblé, la technique de FISH conventionnelle n'a pas détecté de fusion dans une première tentative. L'utilisation de nouvelles sondes a permis de confirmer les résultats du SNG dans un deuxième temps pour chacun de ces cas. Dans un cas de sarcome d'Ewing, le SNG ciblé a révélé une fusion *EWSR1-FL1* plus rare (fusion de l'exon 10 du gène *EWSR1* à l'exon 5 du gène *FL1*) qui n'avait pas été détectée par la RT-PCR. Subséquemment, la synthèse de nouvelles amorces basées sur la séquence de la fusion détectée par le SNG ciblé et un séquençage de Sanger ont permis de confirmer la présence de la fusion. Toutefois, la technique de SNG ciblé n'a pas permis la détection d'une translocation impliquant le gène *EWSR1* détectée par FISH chez une patiente. Sur 11 échantillons ne répondant pas aux critères de qualité pour l'analyse par SNG, 5 ont révélé la présence d'une fusion par FISH. Les auteurs ont rapporté un taux d'échec de 14 % de l'approche par SNG, qu'ils ont attribué au processus de décalcification ou de fixation de certains échantillons.

Selon les auteurs de l'étude, l'utilisation d'une approche de SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex démontrerait des résultats supérieurs aux techniques de FISH et de RT-PCR lorsque les critères de qualité des échantillons sont remplis pour les cas négatifs de fusion.

Données de validation du fabricant de la trousse

Des analyses de concordance de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel avec les techniques de FISH et de RT-PCR pour la détection de transcrits de fusion ont été effectuées (tableau 5)²¹. Les données montrent qu'il y a une concordance de la trousse commerciale avec les techniques de FISH et de RT-PCR pour les trois échantillons analysés.

²¹ Données provenant du feuillet de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel (Illumina), disponible à : <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/trusight-rna-fusion-data-sheet-1170-2016-003.pdf> (consulté le 15 août 2018).

Afin d'évaluer la capacité de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel à détecter des fusions à partir d'échantillons de tissus FFPE (dont l'ARN est souvent dégradé), le fabricant a analysé huit échantillons dont l'ARN était de qualité variable. Le logiciel Local Run Manager RNA Fusion Module (Illumina^{MC}) a été utilisé pour l'identification des fusions à partir des résultats de séquences (tableau 6). Les résultats montrent qu'une librairie peut être préparée à partir de seulement 10 ng d'ARN total de tissu congelé ou de 20 ng d'ARN de tissu FFPE.

Tableau 5 Concordance de la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel pour la détection de fusion avec les techniques de FISH et RT-PCR

TRUSIGHT ^{MC} RNA FUSION PANEL						RT-PCR	FISH
ÉCHANTILLON	FUSION	SÉQUENCE DE FUSION (N)	SÉQUENCE DE RÉFÉRENCE (GÈNE 1)	SÉQUENCE DE RÉFÉRENCE (GÈNE 2)	COORDONNÉES CYTOGÉNÉTIQUES	RÉSULTATS	RÉSULTATS
1	BCR-ABL1 ABL1-BCR	205 7	462 23	67 392	Rsa(22;9) (q11.23;q34.12) Rsa(9;22) (q34.12; q11.23)	BCR-ABL	BCR-ABL1
2	AF4-MLL MLL-AF4	57 16	443 22	59 272	Rsa(4;11) (q21.3;q23.3) Rsa(11;4) (q23.3;q21.3)	MLL-AF4	Réarrangement <i>MLL</i>
3	WWTR1- CAMTA1	21	178	5	Rsa(3;1) (q25.1;q36.23)	WWTR1-CAMTA1	n.d.

Abréviation : n. d. : Non disponible.

Tableau 6 Détection de fusions dans des échantillons de FFPE avec la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion Panel

ÉCHANTILLON	DV ₂₀₀	ARN TOTAL DE DÉPART	SÉQUENCE PF PAR ÉCHANTILLON	FUSION ATTENDUE	RÉSULTAT
FFPE-1	32	100 ng	2,99 M	EWSR1-FL1	fusion détectée
FFPE-2	64	50 ng	3,02 M	EWSR1-FL1	fusion détectée
FFPE-3	72	20 ng	3,39 M	SS18-SSX2	fusion détectée
RHU	s. o.	10 ng	3,95 M	BCR-ABL1 BCAS4-BCAS3 NUP214-XKR3	fusions détectées
FFPE-5	74	50 ng	3,99 M	EML4-ALK	fusion détectée
FFPE-6	57	50 ng	3,12 M	SS18-SSX1	fusion détectée
FFPE-7	n.d.	50 ng	3,25 M	RP2-BRAF	fusion détectée
FFPE-8	n.d.	20 ng	2,68 M	LMNA-NTRK1	fusion détectée*

Abréviations : DV₂₀₀ : Pourcentage de fragments d'ARN de plus de 200 nucléotides; FFPE : Tissu fixé au formaldéhyde et enrobé de paraffine; n. d. : Non disponible; PF : *Passing filter* (mesure de pureté du signal de chaque groupe de séquences lors de l'amplification); RHU : Séquence de référence humaine universelle; s. o. : Sans objet.

* Fusion détectée en abaissant le seuil du score de confiance du logiciel *Local Run Manager* de 0,6 à 0,5.

5.7. Données fournies par le demandeur

Le centre demandeur a fourni un document de validation analytique de 65 pages repris de manière presque intégrale dans cette section.

Spécificité analytique

Le centre demandeur a d'abord voulu vérifier si cette nouvelle technique de détection des fusions impliquées dans les cas de sarcomes par SNG donnait des résultats identiques aux techniques actuellement utilisées (études histologiques et immunohistochimiques conventionnelles, et RT-PCR, lorsque possible). Pour ce faire, ils ont sélectionné 34 échantillons de sarcomes différents précédemment analysés par la pathologiste spécialisée en sarcomes de leur établissement, par des analyses histologiques et immunohistochimiques. De ceux-ci, 10 avaient également été analysés par un laboratoire externe désigné pour l'analyse de la fusion suspectée par RT-PCR.

Ces échantillons avaient tous été prélevés entre 2006 et 2017 et étaient principalement des coupes en rubans de bloc FFPE (n = 29) ou des tissus congelés (n = 5).

Pour leur étude, 19 types de sarcomes différents ont été testés.

Le tableau 7 résume les résultats obtenus à partir des fichiers de résultats générés par les logiciels bio-informatiques utilisés (*Local Run Manager* et JAFFA).

Tableau 7 Résultats de l'étude de validation sur la détection de fusions impliquées dans les sarcomes à l'aide du panel SNG

ÉCHANTILLON	DIAGNOSTIC PRÉMOLECULAIRE	CONFIRMÉ PAR PCR	NOMBRE DE LECTURES (SNG)	DIAGNOSTIC DU PANEL DE FUSIONS SNG	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
1	dermatofibrosarcome	non	2 631 462	aucun	fusion inconnue <i>KANSL1-KAT6B</i>	5/28
2	dermatofibrosarcome	non	4 322 971	dermatofibrosarcome	<i>COLA1-PDGFB</i>	670/0
3	sarcome fibromyxoïde de bas grade	positif pour <i>CREB3L2-FUS</i>	2 659 257	sarcome fibromyxoïde de bas grade	<i>CREB3L2-FUS</i> , <i>FUS-CREB3L2</i>	33/36
4	fibrosarcome épithélioïde sclérosant	non	4 136 010	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s. o.
5	fibrosarcome infantile	négatif pour <i>ETV6-NTRK3</i>	2 540 683	aucun	aucune	s. o.
6	tumeur solitaire fibreuse	négatif pour <i>SS18-SSX1/SSX2</i>	4 587 657	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	283/nd
7	tumeur solitaire fibreuse	non	4 125 898	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	17/24
8	tumeur solitaire fibreuse	non	2 784 377	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	82/0
9	tumeur myofibroblastique inflammatoire	non	2 807 613	aucun	aucune	s. o.
10	tumeur myofibroblastique inflammatoire ou sarcome synovial	quantité d'ARN trop faible	4 680 030	aucun	aucune (ratio sous-optimal) biopsie trocart	s. o.
11	histiocytome fibreux angiomatoïde	positif pour <i>EWSR1-CREB1</i>	2 877 930	histiocytome fibreux angiomatoïde	<i>EWSR1-CREB1</i>	14/34
12	sarcome synovial	positif pour <i>SS18-SSX1/SSX2</i>	4 070 101	sarcome synovial	<i>SS18-SSX1</i>	270/22
13	sarcome synovial	oui	2 339 308	sarcome synovial	<i>SS18-SSX1</i>	88/518
14	sarcome synovial suspecté	négatif pour <i>SS18-SSX1/SSX2</i>	1 849 981	sarcome synovial	<i>SS18-SSX1</i>	168/nd
15	tumeur solitaire fibreuse	non	3 478 569	tumeur solitaire fibreuse	<i>NAB2-STAT6</i>	66/241
16	sarcome d'Ewing	non	3 282 502	sarcome d'Ewing	<i>EWSR1-FLI1</i>	0/22
17	sarcome d'Ewing	oui	2 918 611	sarcome d'Ewing	<i>EWSR1-FLI1</i>	90/153
18	sarcome d'Ewing	oui (HMR)	2 646 579	sarcome d'Ewing	<i>EWSR1-FLI1</i>	12/nd

ÉCHANTILLON	DIAGNOSTIC PRÉMOLECULAIRE	CONFIRMÉ PAR PCR	NOMBRE DE LECTURES (SNG)	DIAGNOSTIC DU PANEL DE FUSIONS SNG	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
19	tumeur desmoplastique à petites cellules rondes	négatif pour fusions <i>EWSR1-FLI1</i> et <i>EWSR1-ERG</i>	2 956 449	sarcome d'Ewing	<i>FUS-ERG</i>	112/90
20	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	négatif pour <i>EWSR1-NR4A3</i> , <i>TAF15-NR4A3</i> , <i>EWSR1-FLI1</i> , <i>EWSR1-ERG</i> , <i>EWSR1-TEC</i> et <i>TAF2N-TEC</i>	5 383 090	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	<i>EIF4A2-NR4A3</i>	1 282/11
21	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	positif pour <i>TAF15-NR4A3</i>	2 699 501	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	<i>TAF15-NR4A3</i>	10/19
22	sarcome à cellules claires	positif pour <i>EWSR1-ATF1</i>	2 943 544	sarcome à cellules claires	<i>EWSR1-ATF1</i>	49/82
23	myoépithéliome	négatif pour <i>EWSR1-TEC</i>	2 055 082	chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	<i>TCF12-NR4A3</i>	129/176
24	myoépithéliome	non	2 107 836	aucun	aucune	s.o.
25	rhabdomyosarcome alvéolaire	positif pour <i>PAX7-FOXO1</i>	4 187 604	rhabdomyosarcome alvéolaire	<i>PAX7-FOXO1</i>	19/304
26	rhabdomyosarcome alvéolaire	positif pour <i>PAX3-FOXO1</i>	2 586 192	rhabdomyosarcome alvéolaire	<i>PAX3-FOXO1</i>	39/75
27	liposarcome myxoïde	non	2 863 920	liposarcome myxoïde	<i>FUS-DDIT3</i> , <i>DDIT3-FUS</i>	27/146
28	liposarcome myxoïde	non	941 966	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s.o.
29	hémangioendothéliome épithélioïde	non	4 090 590	hémangioendothéliome épithélioïde	<i>WWTR1-CAMTA1</i>	74/341
30	tumeur du stroma endométrial de haut grade	non	3 122 919	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s.o.
31	tumeur du stroma endométrial de haut grade	non	4 724 021	fusion inconnue	<i>WDR70-NUP155</i>	166/207

ÉCHANTILLON	DIAGNOSTIC PRÉMOLECULAIRE	CONFIRMÉ PAR PCR	NOMBRE DE LECTURES (SNG)	DIAGNOSTIC DU PANEL DE FUSIONS SNG	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
32	tumeur du stroma endométrial de bas grade	non	3 727 334	aucun	aucune	s.o.
33	tumeur du stroma endométrial de bas grade	non	3 203 421	aucun	aucune	s.o.
34	tumeur du stroma endométrial de bas grade	non	74 482	aucun	aucune (ratio sous-optimal)	s.o.

Légende :

Diagnostic de la pathologie : Diagnostic extrait du rapport de pathologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, basé sur les études histologiques, immunohistochimiques et moléculaires (lorsque disponibles).

Confirmé RT-PCR : Fusion testée par RT-PCR au CHU de Québec.

Nombre de lectures : Nombre de lectures totales de l'échantillon selon le logiciel *Local Run Manager* d'Illumina^{MC}.

Diagnostic du panel de fusions SNG : Diagnostic évoqué en fonction des fusions détectées par le panel SNG et confirmé par les différentes bases de données.

Nombre de lectures de fusion *Local Run Manager* /JAFFA : Nombre de lectures spécifiques de la fusion détectée, extrait des logiciels *Local Run Manager* et JAFFA, respectivement.

De ce tableau, les informations suivantes peuvent être tirées :

Tableau 8 Concordance des fusions détectées par rapport au diagnostic histologique (n = 34)

FUSION DÉTECTÉE PAR LE LABORATOIRE EXTERNE	FUSION DÉTECTÉE PAR LE PANEL SNG	NOMBRE DE CAS	NOMBRE DE CAS (%)
Identique	identique	11	32 %
Non testée	conforme au diagnostic	7	21 %
Négatif par RT-PCR	conforme au diagnostic	2	6 %
Non testée	différente du diagnostic	2	6 %
Non testée	différente du diagnostic (fusion de nature inconnue)	2	6 %
Non testée	aucune	4	12 %
Non testée	spécimens ne remplissant pas les standards de qualité	6	18 %
TOTAL		34	100 %

À noter que suite aux résultats de SNG, la présence de toutes les fusions trouvées par SNG dans chacun des échantillons a été confirmée localement, par RT-PCR ou par qPCR (Ewing - Synovial), ce qui confirme la spécificité de l'analyse SNG.

Selon le demandeur, ces données permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Pour tous les spécimens de sarcomes ayant eu une fusion détectée par RT-PCR (plus de 30 % des cas), cette même fusion est détectée avec le panel de fusions par SNG. La spécificité et la sensibilité de la technique par SNG sont donc équivalentes à la RT-PCR.
- Dans sept échantillons supplémentaires, dont les analyses moléculaires n'avaient pas été effectuées, des fusions ont été détectées, ce qui confirme du même coup le diagnostic de ces sarcomes, établi par le pathologiste. Dans ces cas, l'analyse SNG était la seule preuve moléculaire confortant le diagnostic du sarcome.
- Pour deux échantillons, la technique par RT-PCR (soit le *Gold Standard* en détection de fusion) ne parvenait pas à confirmer le diagnostic différentiel du pathologiste. Toutefois, le panel de fusion par SNG a permis de les identifier. Dans un des cas (échantillon n° 14), une délétion de 130 nucléotides rendait impossible la liaison d'une amorce utilisée pour la détection du sarcome synovial et dans le deuxième cas (échantillon n° 20), les fusions retrouvées par SNG étaient des fusions à incidences rares dans les chondrosarcomes myxoïdes extrasquelettiques. La RT-PCR ciblant cette fusion rare n'avait donc pas été développée par le laboratoire externe. Le SNG permet donc d'éviter les diagnostics de sarcome erronés causés par les limitations techniques de la RT-PCR.
- Le laboratoire demandeur a obtenu une divergence de diagnostic relatif au type de sarcome présent pour deux spécimens en comparant les analyses de pathologie et celles de SNG : Dans le cas de l'échantillon n° 19, le rapport du pathologiste soulève, comme diagnostic différentiel, un sarcome d'Ewing et, de manière moins certaine, une tumeur desmoplastique à petites cellules rondes. Toutefois, les analyses par RT-PCR effectuées dans un centre externe se sont avérées négatives pour les fusions *EWSR1-FLI1* et *EWSR1-ERG*, ce qui réfute

le diagnostic de sarcome d'Ewing. Par conséquent, le diagnostic final retenu était une tumeur desmoplastique à petites cellules rondes, connue pour être associée avec les translocations *EWSR1-WT1* ou *EWSR1-ERG*. Ainsi, grâce à l'analyse de SNG, la présence de la fusion *FUS-ERG* a pu être détectée, soit une fusion plus rare retrouvée dans les sarcomes d'Ewing et n'ayant pas été développée dans le centre externe ayant effectué l'analyse initiale, confirmant le diagnostic de sarcome d'Ewing.

- Pour l'échantillon n° 23, à la lecture du rapport final de pathologie, le laboratoire demandeur a compris que les analyses effectuées par le pathologiste ne lui permettaient pas de conclure quel était le type de sarcome exact qui se retrouvait dans l'échantillon analysé. Son diagnostic différentiel suggérait un myoépithéliome des tissus mous, un chondrosarcome myxoïde extrasquelettique, une tumeur fibromyxoïde ossifiante ou un chondrome des tissus mous. Toutefois, le diagnostic choisi fut le myoépithéliome, en raison de l'absence de détection de fusion par les techniques moléculaires du centre externe. Grâce au panel de fusions de SNG, un diagnostic de chondrosarcome myxoïde extrasquelettique a pu être posé. À la lueur de ces nouveaux résultats moléculaires, le pathologiste a confirmé être en accord avec ce diagnostic corrigé.
- Pour deux échantillons, le n° 1 (dermatofibrosarcome) et le n° 31 (tumeur du stroma endométrial de haut grade), la présence de nouvelles fusions n'ayant jamais été répertoriées dans les sarcomes, ni dans les différentes bases de données énumérées²² a été détectée. Pour l'échantillon n° 1, une recherche de la littérature a démontré que cette fusion a déjà été observée dans une tumeur bénigne du muscle lisse de type léiomyome rétropéritonéal. Pour l'échantillon n° 31, il s'agit d'une nouvelle fusion n'ayant jamais été rapportée dans la littérature. Puisqu'aucun lien ne peut être fait entre les translocations trouvées et les sarcomes pour ces deux spécimens, la conduite sera de ne pas rapporter ces fusions au rapport de pathologie. Pour l'étude de validation, un des spécimens a été validé par RT-PCR et a confirmé la présence de cette nouvelle fusion.
- Pour 12 % des échantillons testés (total de quatre spécimens), l'analyse n'a pas été en mesure de détecter de fusions, ce qui confirme le diagnostic retenu par le pathologiste. Quelques explications peuvent être ici évoquées :
 - Bien que le sous-type de sarcome détecté par le pathologiste lors de ses analyses histologiques et immunohistochimiques soit connu pour être associé à des fusions intergéniques, cela ne garantit pas qu'une fusion se trouve réellement dans l'échantillon du patient. Selon le demandeur, la

²² Base de données Mitelman sur les anomalies chromosomiques et les fusions intergéniques impliquées dans le cancer

<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

<http://cgap.nci.nih.gov/Genes/GeneFinder>

Base de données Quiver de la compagnie Archer, rapportant les fusions intergéniques

<http://quiver.archerdx.com/>

Base de données COSMIC Fusion

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/fusion>

Base de données sur les fusions, par le MD Anderson/TCGA

<http://www.tumorfusions.org/>

Base de données sur les fusions, par Universidad de Navarra

<http://www.unav.es/genetica/TICdb/>

pénétrance d'une fusion versus le sous-type de sarcome associé peut varier de 10 % à 100 %.

- L'échantillon analysé contient des fusions non caractérisées, mais les deux partenaires ne se trouvent pas ciblés dans le panel TruSight^{MC} RNA Fusion.
- Le ratio de cellules sarcomateuses par rapport aux cellules normales est trop faible. Pour pallier cette problématique, le pathologiste devra confirmer la présence d'une bonne proportion (> 20 %) de tissu sarcomateux dans les échantillons afin de pouvoir effectuer la demande du panel de fusions par SNG.
- Un niveau d'expression trop faible du gène fusionné peut rendre sa détection impossible.
- Une fusion entre deux gènes juxtaposés, dans la même orientation et sur le même chromosome, peut être éliminée par les filtres bio-informatiques utilisés. En effet, advenant une fusion entre deux gènes, la distance minimale doit être de 100 000 nucléotides (valeur modifiable). Cette contrainte a comme but d'empêcher la détection de fusions faux-positives causées par la poursuite de transcription au travers du gène suivant (*readthrough transcript*).
- Finalement, six des spécimens testés (n° 4, n° 9, n° 10, n° 28, n° 30 et n° 34), ont été considérés comme n'étant pas de qualité suffisante pour que le résultat soit fiable. Plusieurs raisons expliquent cette absence de résultat :
 - Bien que l'ARN extrait réponde aux standards de qualité (DV₂₀₀, résultats de Bioanalyser), la librairie peut parfois se retrouver en qualité ou en quantité sous-optimale (via analyses sur puces ADN Bioanalyser). Les échantillons n° 10 et n° 28 en sont de bons exemples avec aucune fusion détectée, possiblement en raison d'un nombre de lectures bien en deçà des deux millions requises. Vraisemblablement, un problème technique est survenu lors de la préparation des librairies (ex. : perte d'échantillon lors de la purification par billes magnétiques, erreur de manipulation des réactifs, etc.). L'expérience avec le séquençage de ces échantillons a quand même été poursuivie pour l'étude de validation, afin d'en documenter l'impact sur les résultats finaux. Les résultats ont confirmé que ces extractions étaient inadéquates. Toutefois, la conduite aurait été différente avec des échantillons cliniques où ces deux librairies auraient été reprises après l'échec de ce point de contrôle de qualité.
 - L'échantillon est de trop petite taille ou de mauvaise qualité. Pour l'échantillon n° 34, il s'agissait d'une biopsie à l'aiguille de trop petite taille pour extraire une quantité suffisante d'ARN. Le laboratoire externe a également été confronté à la même problématique, selon le rapport officiel. Des rubans de coupes supplémentaires devraient alors être demandés au laboratoire de pathologie afin d'augmenter la quantité de cellules à extraire.
 - Plus les échantillons fixés au formaldéhyde (FFPE) sont vieux, plus l'ARN risque d'être dégradé. Ceci a été constaté lors de tests avec un échantillon datant de 2006 (résultats non montrés) et dont la qualité de l'ARN extrait était sous-optimale.

- Finalement, pour les échantillons n° 4, n° 9 et n° 30, l'ARN était de bonne qualité, la librairie finale de taille et en quantité attendue et le nombre de lectures était supérieur à deux millions. Toutefois, le point de contrôle final d'expression des 15 *pseudo-housekeeping genes* a échoué. Les résultats du panel de fusion obtenus pour ces échantillons n'étaient donc pas fiables et, dans un contexte clinique, l'expérience devrait être répétée à partir du début.

La spécificité analytique de la technique a également été confirmée en vérifiant la présence de fusions dans sept lignées cellulaires commercialisées et connues pour être porteuses de fusions. Le tableau 9 présente les résultats de fusions attendus et obtenus à l'aide du panel de gènes de fusion. Une corrélation de 100 % a été obtenue, ce qui démontre la capacité de ce panel à détecter des fusions entre divers gènes.

Tableau 9 Validation du panel de gènes de fusion TruSight RNA^{MC} Fusion avec sept lignées cellulaires décrites

ÉCHANTILLON	LIGNÉE CELLULAIRE	NO DE PRODUIT COMMERCIAL	FUSION DÉCRITE	NOMBRE DE LECTURES	FUSION TROUVÉE	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)
1	K562	ATCC-CCL-243	<i>BCR-ABL, NUP214-XKR3</i>	2 934 338	<i>BCR-ABL, NUP214-XKR3</i>	123/291 16/29
2	SupB15	ATCC-CRL-1929	<i>BCR-ABL</i>	4 322 971	<i>BCR-ABL</i>	49/80
3	MV-4-11	ATCC-CRL-9591	<i>AFF1-KMT2A</i>	4 531 494	<i>AFF1-KMT2A</i>	245
4	EOL	DSMZ-ACC-386	<i>FIP1L1-PDGFR</i>	2 767 540	<i>FIP1L1-PDGFR</i>	20/0
5	NB4	DSMZ-ACC-207	<i>PML-RARA</i>	2 706 834	<i>PML-RARA</i>	24/8
6	A-673	ATCC-CRL-1598	<i>EWSR1-FLI1</i>	7 126 381	<i>EWSR1-FLI1</i>	47/446
7	RD-ES	ATCC-HTB-166	<i>EWSR1-FLI1</i>	2 933 807	<i>EWSR1-FLI1</i>	168/1 281

Sensibilité analytique et limites de détection

Les résultats obtenus avec l'utilisation du panel TruSight^{MC} RNA Fusion par SNG étaient d'ordre qualitatif (présence ou absence de fusion) et non pas quantitatif. Cette analyse est réservée aux cas diagnostiques et ne pourrait être utilisée dans le cas de recherche de maladie résiduelle. Le centre demandeur a tout de même analysé la sensibilité analytique relative de cette nouvelle analyse. Pour ce faire, ils ont utilisé deux approches différentes.

Dans la première, un échantillon connu pour porter la fusion *BCR-ABL* a été dilué de manière sérieée. Des dilutions de cet échantillon de 10 %, 1 % et 0,1 % (non montré) ont été effectuées. Comme démontré dans le tableau 10, une linéarité dans le nombre de fusions détectées en fonction des dilutions effectuées est observée. Cette expérience a également permis de mettre en évidence le fait que la sensibilité de la technique est dépendante de l'expression de la fusion générée par le transcrit, ainsi que par la quantité de cellules porteuses de la fusion dans l'échantillon. Par conséquent, une fusion très fortement exprimée dans peu de cellules sarcomateuses pourra être détectée et, inversement, une fusion étant très peu exprimée pourrait ne pas être détectée en présence d'un nombre appréciable de cellules sarcomateuses. Chaque fusion aura donc un niveau d'expression différent et, par conséquent, une sensibilité différente.

Tableau 10 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion au niveau de sa sensibilité de détection

ÉCHANTILLON	FUSION DÉCRITE	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager)	
				BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES
Lignée <i>BCR-ABL</i> 100 %	<i>BCR-ABL</i>	4 433 335	<i>BCR-ABL</i>	77	52
Lignée <i>BCR-ABL</i> 10 %		4 390 748	<i>BCR-ABL</i>	6	4
Lignée <i>BCR-ABL</i> 1 %		3 817 036	<i>BCR-ABL</i>	0	0

Abréviation : M : Millions.

Dans la deuxième expérience de sensibilité analytique, le contrôle externe commercial Seraseq^{MC} Fusion RNA v2 a été utilisé. Ce contrôle est composé d'un mélange de plusieurs lignées cellulaires et de constructions artificielles comportant des fragments d'ADN qui encodent la fusion recherchée. Chaque fusion étant par la suite quantifiée par la compagnie à l'aide de la PCR digitale (ddPCR). Le tableau 11 montre la confirmation de 10 des 14 fusions présentes dans ce contrôle commercial. Les fusions non détectées, mais devant pourtant être comprises dans ce contrôle, semblent être celles présentes en moindre quantité. En effet, les fusions *KIF5B-RET*, *SLC34A-ROS1*, *SLC45A3-BRAF* et *TMPRSS2-ERG* étaient parmi les moins abondantes, soit avec moins de 373 copies/ng d'ARN. Toutefois, trois fusions moins abondantes, présentant 283, 316 et 361 copies/ng d'ARN, ont été détectées.

Plusieurs facteurs peuvent affecter l'efficacité et la capacité à détecter la présence de fusions; en voici quelques-uns :

1) Nombre de copies de la fusion (expression de la fusion, nombre de cellules sarcomateuses)

Comme discuté précédemment, plus la fusion est fortement exprimée dans l'échantillon, plus les chances de la détecter sont grandes. De plus, plus la quantité de cellules à analyser est grande, meilleures sont les chances de détection.

2) Possibilité de détecter un seul ou les deux partenaires de la fusion

Durant la fabrication de la librairie, l'étape critique de la détection ou non des fusions est la capture des fusions à l'aide de sondes spécifiques. Les fusions ayant les deux gènes contenus dans le panel démontreront une sensibilité accrue par rapport à celles où un seul des deux partenaires est ciblé.

3) Nombre de sondes couvrant les régions juxtaposées à la fusion

Pour des raisons similaires à celles évoquées en 2, une plus grande variabilité de sondes capables de lier les fragments de librairies (fusions) offrira une plus grande efficacité dans la détection des fusions.

D'autre part, afin de confirmer que le processus expérimental est optimal, trois échantillons ont été partagés avec des collaborateurs de Toronto pour qu'ils soient testés de manière indépendante (voir tableaux 11 et 15). Un des échantillons fournis était de l'ARN provenant du contrôle commercial Seraseq^{MC} Fusion RNA v2 (tableau 11). À l'aide du même panel de gène de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion, ils ont obtenu des résultats très semblables, à quelques petites différences près. En effet, ils ont détecté une fusion *KIF5B-RET* en faible quantité que le centre demandeur n'a pas récupérée, mais ils n'ont pas été en mesure de détecter trois fusions (*CD74-ROS1*, *LMNA-NTRK1* et *EGFR-SEPT14*) détectées par le centre demandeur. À la lumière de ces résultats, il est possible de conclure que le processus analytique du laboratoire demandeur est efficace puisqu'il est similaire à celui de l'un des laboratoires de référence en sarcomes du Canada. L'hypothèse la plus plausible émise par le demandeur, pour expliquer les divergences notées, est que certaines fusions du contrôle commercial se situent autour de la limite de détection de la technique par SNG, ce qui les rend parfois détectables, parfois indétectables.

Dans un souci de protection du patient et dans un contexte où la limite de détection est difficilement évaluable, le demandeur s'engage, sur l'ensemble de la période de validation et de mise en place de la technique (environ un an), à transférer vers les laboratoires externes les échantillons dans lesquels aucune fusion n'aura été détectée, comme c'est le cas actuellement. Après cette période de transition, une compilation des résultats sur les échantillons qui auront été reconnus comme n'étant pas porteurs de fusion sera effectuée et une réévaluation de la pratique sera faite, le cas échéant.

Tableau 11 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion par un contrôle externe commercial Seraseq^{MC} Fusion RNA v2 (lot 10244305)

FUSION ATTENDUE	NOMBRE DE COPIES (copies/ng)	DÉTECTÉE PAR LE LABORATOIRE DEMANDEUR	DÉTECTÉE PAR LE LABORATOIRE EXTERNE
EML4-ALK	316	oui	oui
KIF5B-RET	faible et variable	non	oui (1/2 – 1 copie)
NCOA4 -RET	1 144	oui	oui
CD74-ROS1	361	oui	non
SLC34A -ROS1	286	non	non
TPM3-NTRK1	544	oui	oui
FGFR3-BAIAP2L1	419	oui	oui
PAX8-PPARG1	1 107	oui	oui
FGFR3-TACC3	391	oui	oui
LMNA -NTRK1	283	oui	non
SLC45A3-BRAF	373	non	non
TMPRSS2-ERG	157	non	non
EGFR- SEPT14	861	oui	non
ETV6-NTRK3	1 579	oui	oui
TOTAL		10/14	8/14

Note : Les gènes en caractère gras ne sont pas couverts par le panel TruSight^{MC} RNA Fusion.

Robustesse de la méthode

Dans le but de démontrer la robustesse de l'approche utilisée, une expérience de reproductibilité intra-expérience avec un spécimen analysé en triplicata et deux autres en duplicata a été réalisée, et ce, avec une librairie unique pour chaque échantillon. Cela a permis de couvrir l'ensemble des étapes de fabrication des bibliothèques ainsi que celle du séquençage. La compilation des résultats du tableau 12 permet de constater que pour ces trois spécimens dérivés de sarcomes avec des fusions différentes, le nombre de fusions obtenu par le panel SNG est similaire, ce qui démontre la reproductibilité de la technique.

Tableau 12 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion : Reproductibilité intra-expérience n° 1

ÉCHANTILLON	FUSION DÉCRITE	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)	
				BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES
Sarcome synovial 1A	SS18-SSX1	4 070 101	SS18-SSX1	270/nd	199
Sarcome synovial 1B		3 376 435	SS18-SSX1	314/nd	279
Sarcome synovial 1C		3 740 801	SS18-SSX1	281/nd	225
Tumeur solitaire fibreuse 1A	NAB2-STAT6	4 384 001	NAB2-STAT6	243/nd	166
Tumeur solitaire fibreuse 1B		4 587 657	NAB2-STAT6	283/nd	185
Sarcome d'Ewing 1A	EWSR1-FLI1	2 646 579	EWSR1-FLI1	12/nd	14
Sarcome d'Ewing 1B		4 948 745	EWSR1-FLI1	5/nd	3

Abréviations : M : Millions; nd : Non déterminé.

Une deuxième expérience de reproductibilité intra-expérience a été effectuée en répétant sept fois le même spécimen (une lignée cellulaire) à l'aide de librairies différentes avec un séquençage commun. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 13 et montrent la reproductibilité intra-expérience du panel de gènes TruSight^{MC} RNA Fusion. La variation maximale entre le nombre de fusions détectées dans chaque analyse pour les fusions *AFF1-KMT2A* et *KMT2A-AFF1* était respectivement de 29 et de 21. Les écarts types obtenus montrent que ce panel n'est pas conçu pour quantifier précisément des transcrits de fusions, mais plutôt pour donner une information globale de détection ou non de fusions. En aucun cas, l'information sur le nombre de fusions détectées par l'utilisation du panel de fusions par SNG ne sera utilisée ou communiquée, afin d'éviter toute tentative de corrélation entre le nombre de fusions et l'état ou le niveau de la pathologie, corrélation qui serait erronée.

**Tableau 13 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA
Fusion : Reproductibilité intra-expérience n° 2**

ÉCHANTILLON	FUSIONS ATTENDUES (VALIDÉES)	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)		
				BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES	
MV-4-11 n° 1	AFF1-KMT2A KMT2A-AFF1	4 531 494	AFF1-KMT2A	245	162	
			KMT2A-AFF1	111	73	
MV-4-11 n° 2		4 390 748	AFF1-KMT2A	198	135	
			KMT2A-AFF1	116	79	
MV-4-11 n° 3		3 817 036	AFF1-KMT2A	279	219	
			KMT2A-AFF1	154	121	
MV-4-11 n° 4		3 764 398	AFF1-KMT2A	220	175	
			KMT2A-AFF1	128	102	
MV-4-11 n° 5		3 598 398	AFF1-KMT2A	222	185	
			KMT2A-AFF1	124	103	
MV-4-11 n° 6		3 883 385	AFF1-KMT2A	232	179	
			KMT2A-AFF1	133	103	
MV-4-11 n° 7		3 337 457	AFF1-KMT2A	236	212	
			KMT2A-AFF1	146	131	
Moyenne AFF1-KMT2A					181 ± 29	
Moyenne KMT2A-AFF1					102 ± 21	

Abréviation : M : Millions.

De plus, la robustesse de la technique a été vérifiée par son pouvoir de reproductibilité inter-expériences où des spécimens étaient analysés à partir de librairies différentes, à des journées différentes et lors d'expériences de séquençage différentes. Pour ce faire, la lignée cellulaire K562 décrite précédemment pour contenir deux fusions différentes, chacune exprimée à un niveau différent, a été utilisée. Le tableau 14 résume les résultats obtenus lors de ces analyses. Malgré une variation supérieure aux expériences de reproductibilité intra-expérience, les deux fusions peuvent être détectées dans chacune des expériences, et ce, à des niveaux similaires.

Tableau 14 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion : Reproductibilité inter-expériences

ÉCHANTILLON	EXPÉRIENCE	FUSION DÉCRITE (VALIDÉE)	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	NOMBRE DE LECTURES DE FUSION (Local Run Manager/JAFFA)	
					BRUT	CORRIGÉ À 3 M DE LECTURES
Lignée cellulaire K562	1	BCR-ABL NUP214-XKR3	1 543 857	BCR-ABL	244	474
				NUP214-XKR3	44	86
	2		2 031 685	BCR-ABL	383	566
				NUP214-XKR3	43	63
	3		1 497 413	BCR-ABL	168	337
				NUP214-XKR3	27	54
Moyenne BCR-ABL						459 ±115
Moyenne NUP214-XKR3						68 ±17

Abréviation : M : Millions.

Finalement, le demandeur a voulu vérifier que le processus analytique entier (contrôle qualité sur l'ARN, quantification de l'ARN, fabrication de la librairie, quantification des librairies, séquençage et analyse des résultats) était similaire à celui d'un laboratoire ayant beaucoup d'expérience avec le panel de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion, soit plus de 400 échantillons de sarcomes séquencés par SNG. Pour ce faire, des ARN extraits (trois différents : le contrôle externe commercial ainsi que les échantillons inter-laboratoire n° 1 et n° 2), de même que deux librairies pour les échantillons inter-laboratoires n° 1 et n° 2 générées dans le laboratoire demandeur (résultats non montrés) ont été soumis au laboratoire *Molecular Diagnostics Pathology & Lab Medicine* du Mount Sinai Hospital afin qu'ils soient intégrés aux échantillons de routine de leur laboratoire. En effet, une corrélation de 100 % a été obtenue pour les résultats issus des librairies préparées dans le laboratoire local (cette étape permet de vérifier l'efficacité à séquencer et à interpréter les résultats), de même qu'une efficacité légèrement supérieure à partir de l'ARN (cette étape permet de vérifier l'ensemble du processus) en comparant les résultats obtenus avec ceux de Toronto. En effet, pour les deux échantillons inter-laboratoire, la corrélation est de 100 %, tandis que pour le contrôle externe commercial, le laboratoire local a détecté deux fusions supplémentaires, qui semblaient toutefois très peu abondantes.

Tableau 15 Validation du panel de gènes de fusion TruSight^{MC} RNA Fusion par l'échange de deux spécimens avec un laboratoire de Toronto accrédité pour effectuer cette analyse en Ontario

ÉCHANTILLON	NOMBRE DE LECTURES	FUSIONS TROUVÉES	DÉTECTÉE (laboratoire local)	DÉTECTÉE (laboratoire externe)
Inter-laboratoire n° 1	2 631 462	<i>KMT2A-YAP1</i>	oui	oui
		<i>YAP1-KMT2A</i>	oui	oui
Inter-laboratoire n° 2	4 322 971	<i>FGFR1-CEP83</i>	oui	oui

Selon le demandeur, les résultats obtenus lors des expériences réalisées sur des échantillons cliniques montrent que l'utilisation du panel TruSight^{MC} RNA Fusion pour la détection de fusions associées aux sarcomes est un moyen d'obtenir des diagnostics précis, s'appuyant sur des données moléculaires fiables.

La compagnie Illumina^{MC} assure que les 507 fusions de gènes incluses dans le panel TruSight^{MC} RNA Fusion sont complètement couvertes (les 7 690 exons) par des sondes (de 80 nucléotides en moyenne), ce qui permet de purifier chacun de ces gènes (fusionnés ou non). De plus, afin de s'assurer que les extrémités de chaque gène sont couvertes, des sondes ciblant 160 nucléotides au niveau du 5' UTR et du 3' UTR sont utilisées. Au total, 21 283 sondes se trouvent dans la trousse TruSight^{MC} RNA Fusion. La compagnie fournit l'information permettant de visualiser toutes les régions couvertes.

Le centre demandeur a vérifié, pour chacun des 94 gènes liés aux sarcomes d'intérêt, si la couverture de ceux-ci est complète (tableau 16).

Tableau 16 Couverture des 94 gènes de la trousse TruSight^{MC} Fusion vérifiée par le centre demandeur

Gène	Couverture (%)	Régions couvertes par NGS (décrire)	Gène	Couverture (%)	Régions couvertes par NGS (décrire)
ALK	100	Tous les exons + 160 nt du 5' et du 3' UTR	NR4A3	97.1	Tous les exons sauf : 102390347-102390714 = 167 nt
ASPSR1	100	idem	NTRK3	100	Tous les exons + 160 nt du 5' et du 3' UTR
ATF1	100	idem	NUTM2B	100	idem
ATIC	100	idem	OMD	100	idem
BCOR	100	idem	PATZ1	100	idem
CAMTA1	100	idem	PAX3	100	idem
CAR5	100	idem	PBX1	100	idem
CCNB3	100	idem	PDGFB	100	idem
CDH11	100	idem	PDGFRB	100	idem
CDX1	100	idem	PHF1	100	idem
CIC	100	idem	PLAG1	100	idem
CLTC	100	idem	POU5F1	100	idem
CNBP (ZNF9)	100	idem	PPFIBP1	100	idem
COL1A1	100	idem	PRKAR1A	100	idem
COL1A2	100	idem	RANBP2	100	idem
COL6A3	100	idem	RAD51B (RAD51L1)	100	idem
CREB1	100	idem	ROS1	100	idem
CREB3L1	100	idem	RREB1	100	idem
CREB3L2	100	idem	SEC31A	100	idem
CSF1	100	idem	SFPQ	100	Tous les exons sauf : 33638323-33638305 = 182 nt
DDIT3	100	idem	SMARCA5	100	idem
DUX4	100	idem	SP3	100	idem
EML4	100	idem	SRF	100	idem
EPC1	100	idem	SS18	100	idem
ERG	100	idem	SS18L1	100	idem
ETV1	100	idem	SSX1	100	idem
ETV4	100	idem	SSX2	100	idem
ETV6	100	idem	SSX4	100	idem
EWSR1	100	idem	STAT6	100	idem
FEV	100	idem	SUZ12	100	idem
FGFR1	100	idem	TAF15	100	idem
FLI1	100	idem	TCF12	100	idem
FOXO1	100	idem	TEAD1	100	idem
FOXO4	100	idem	TFE3	100	idem
FUS	100	idem	TFG	100	idem
GLI1	98.3	Tous les exons sauf : 37864097-37864160 = 63 nt	TGFBR3	100	idem
HAS2	100	idem	THRAP3 (TRAP150)	100	idem
HEY1	100	idem	TPM3	100	idem
IRF2BP2	100	idem	TPM4	100	idem
JAZF1	100	idem	USP6	100	idem
MBTD1	100	idem	WT1	100	idem
MEAF6	100	idem	WWTR1	100	idem
MYH9	100	idem	YAP1	100	idem
NAB2	89.6	Tous les exons sauf : 37483464-37483634 = 170 nt 37487269-37487383 = 114 nt	YWHAE	100	idem
NCOA1	100	idem	ZC3H7B	100	idem
NCOA2	100	idem	ZNF444	100	idem
NFATC2	100	idem			
NONO	97.4	Tous les exons sauf : 70510567-70510642 = 75 nt			

Cette analyse a permis de révéler une couverture imparfaite dans le cas de cinq gènes, soit : *GLI1*, *NAB2*, *NONO*, *NR4A3* et *SFPQ*. Voici en détail l'analyse de ces couvertures imparfaites et son impact :

GLI1 a une région de 63 nucléotides non couverte (couverture à 98,3 %). Son unique partenaire rapporté est *ACTB*, non couvert par le panel de fusion. Donc, toute fusion *ACTB-GLI1* se produisant dans cette région pourrait être difficilement détectable. Toutefois, les fragments d'ADN complémentaire utilisés lors de l'étape

d'hybridation et de capture ont une taille moyenne de 250 nucléotides permettant la liaison par des sondes avoisinantes.

NAB2 a deux régions de 170 et de 140 nucléotides non couvertes (couverture à 89,6 %). Ses partenaires sont *STAT6* et *PDGFR β* , qui sont couverts à 100 % par le panel de fusion. Donc, toute fusion *NAB2-STAT6* et *NAB2-PDGFR β* sera détectée. Les deux régions non couvertes n'ont donc aucun impact.

NONO a une région de 75 nucléotides non couverte (couverture à 97,4 %). Son unique partenaire rapporté est *TFE3* couvert à 100 % par le panel de fusion. Donc, toute fusion *NONO-TFE3* sera détectée. La région non couverte n'a donc aucun impact.

NR4A3 a une région de 167 nucléotides non couverte (couverture à 97,1 %). Ses partenaires sont *TAF15*, *TGF*, *TCF12*, *EWSR1* et *HSPA8*. Tous sont couverts à 100 % par le panel de fusion, sauf *HSPA8* qui n'est pas couvert. Donc, toute fusion *NR4A3-HSPA8* se produisant dans cette région pourrait être difficilement détectable. Toutefois, cette fusion n'aurait été rapportée que dans un seul article scientifique [Urbini *et al.*, 2017]. L'impact de cette région non couverte serait mineur, selon le demandeur.

SFPQ a une région de 182 nucléotides non couverte (couverture à 95,1 %). Son unique partenaire rapporté est *TFE3*, couvert à 100 % par le panel de fusion. Donc, toute fusion *SFPQ-TFE3* sera détectée. La région non couverte n'a donc aucun impact.

6. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération (SNG). Ce test vise les patients qui ont reçu, à la suite d'une étude histologique conventionnelle, un diagnostic de sarcome dont le sous-type est connu pour être lié à une translocation spécifique, afin de confirmer le diagnostic ou d'exclure un diagnostic différentiel. L'analyse présentée comporte deux scénarios :

- le premier considère la réalisation de l'analyse par SNG en remplacement des analyses par RT-PCR effectuées pour la clientèle desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont), mais réalisées au CHU de Québec – Université Laval (site de L'Hôtel-Dieu de Québec), en plus des cas difficilement classifiables issus de l'analyse par RT-PCR pour l'ensemble du Québec;
- le second considère les coûts liés à la réalisation de l'analyse par SNG en remplacement de celles effectuées par RT-PCR pour l'ensemble du Québec.

Les coûts sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective du MSSS. L'analyse porte sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses s'appuyant sur des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans les tableaux 17 et 18. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- Selon les experts consultés, il y aurait en moyenne 350 nouveaux cas de sarcomes des tissus mous et osseux par année au Québec.

- Parmi ces cas, seul le tiers pourrait requérir une analyse par RT-PCR pour en préciser le diagnostic et uniquement 10 % des cas issus de cette analyse serait jugés difficilement classifiables.
- Ainsi, parmi ces 350 nouveaux cas annuels de sarcomes des tissus mous et osseux, 117 analyses par RT-PCR pourraient être requises. Parmi celles-ci, le tiers concernerait la population desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont), soit environ 39 analyses. Les analyses par RT-PCR requises par le demandeur sont réalisées par le CHU de Québec – Université Laval, qui corrobore cette hypothèse.
- À la suite de l'analyse par RT-PCR, il y aurait alors environ 4 cas difficilement classifiables pour lesquels le CHU de Québec – Université Laval utilise actuellement, si cela est jugé nécessaire pour clarifier la situation, diverses techniques, dont l'analyse par panel réalisée par des collaborateurs hors du Québec. Bien que les coûts liés à ces techniques soient difficilement quantifiables, ces cas pourraient justifier le recours à une analyse par SNG.
- Le demandeur estime plutôt que 50 à 67 analyses seraient réalisées par SNG annuellement au CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont). Ces projections sont considérées dans les analyses de sensibilité présentées dans les tableaux suivants.
- Selon les données médico administratives consultées concernant la volumétrie et le coût des analyses de translocations pour différents sous-types de sarcomes présentement disponibles par RT-PCR, le coût moyen de ces analyses est évalué à 227 \$.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur pour l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG est de 852,65.

Scénario 1 : Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG en remplacement des analyses effectuées par RT-PCR réalisées au CHU de Québec pour la clientèle desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont). Ce scénario intègre aussi les cas difficilement classifiables suivant la RT-PCR pour l'ensemble du Québec

- Les analyses par RT-PCR réalisées par le CHU de Québec – Université Laval pour la population desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont) seraient maintenant réalisées par le centre demandeur, en plus des 10 % de cas jugés difficilement classifiables pour l'ensemble du Québec.
- Ainsi, il est anticipé que 47 analyses par SNG seraient réalisées dans chacune des trois prochaines années, et ce, considérant que l'analyse par SNG permet de diagnostiquer précisément tous les cas de sarcomes des tissus mous et osseux, sans nécessiter d'autres analyses subséquentes.

Tableau 17 Coûts liés à l'introduction au Répertoire du test permettant l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération (SNG)

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout au Répertoire du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération				
Analyses RT-PCR	39	39	39	117
Coûts	8 853 \$	8 853 \$	8 853 \$	26 559 \$ ^a
Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout au Répertoire du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération				
Analyses SNG ^b	47	47	47	141
Coûts	40 075 \$	40 075 \$	40 075 \$	120 225 \$
Impact net	31 222 \$	31 222 \$	31 222 \$	93 665 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			65 693 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			125 390 \$
^a Cela ne considère pas le coût de certaines analyses par FISH ou par IHC ni même des envois hors Québec à des centres collaborateurs pour clarifier les cas difficilement classifiables.				
^b Considère que l'analyse des cas difficilement classifiables du Québec serait réalisée par SNG.				

Scénario 2 : Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG en remplacement des analyses effectuées par RT-PCR pour l'ensemble du Québec

- Dans ce scénario, le remplacement de toutes les analyses effectuées par RT-PCR au Québec est envisagé.
- Ainsi, 117 analyses par SNG seraient réalisées au cours de chacune des trois prochaines années.

Tableau 18 Coûts liés à l'introduction au Répertoire du test permettant l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération (SNG)

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Scénario de base : <u>sans</u> l'ajout du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération au Répertoire				
Analyses RT-PCR	117	117	117	351
Coûts	26 559 \$	26 559 \$	26 559 \$	79 677 \$
Nouveau scénario : <u>avec</u> l'ajout du test permettant d'effectuer l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération au Répertoire				
Analyse SNG	117	117	117	351
Coûts	99 760 \$	99 760 \$	99 760 \$	299 280 \$
Impact net	73 201 \$	73 201 \$	73 201 \$	219 603 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			187 695 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			281 543 \$

L'ajout du test permettant l'analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par séquençage de nouvelle génération pourrait générer des coûts

supplémentaires d'environ 94 000 \$ sur l'ensemble des trois premières années, advenant que l'analyse par SNG soit utilisée en remplacement des analyses de RT-PCR nécessaires pour la population desservie par le CIUSSS de l'Est-de-l'Île-de-Montréal (site Hôpital Maisonneuve-Rosemont) en plus du 10 % des cas jugés difficilement classifiables suivant une analyse par RT-PCR pour l'ensemble du Québec. Des coûts supplémentaires d'environ 220 000 \$ sur l'ensemble des trois prochaines années sont anticipés si l'analyse est introduite en remplacement de toutes les analyses de RT-PCR effectuées pour le Québec.

Selon le demandeur, l'objectif de cette démarche n'est pas de remplacer les analyses en place, faites avec professionnalisme dans un autre laboratoire du Québec. L'introduction de cette approche remplacera d'abord localement les analyses actuellement réalisées ailleurs au Québec. Le premier scénario semble donc celui préconisé par le demandeur.

Enfin, selon les experts consultés, il n'est pas clair actuellement que l'analyse par SNG permettrait une meilleure prise en charge des patients atteints de sarcomes et pourrait donc influencer les coûts liés à celle-ci.

7. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Selon le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) et le European Sarcoma Network Working Group (ESMO), les résultats des analyses devraient toujours être interprétés selon le contexte clinique et les caractéristiques pathologiques du patient [Casali *et al.*, 2018; Von Mehren *et al.*, 2016]. Pour cette raison, le diagnostic de sarcome devrait être établi par un pathologiste ayant accès à ces analyses supplémentaires.

Les analyses moléculaires peuvent influencer la stratégie de traitement [Italiano *et al.*, 2016]. Notamment, Italiano et ses collaborateurs soulignent que la correction diagnostique a permis à certains patients d'éviter une morbidité associée à une chimiothérapie qui n'était pas nécessaire et certains patients ont, au contraire, pu bénéficier d'un traitement mieux adapté.

8. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Aucune recommandation spécifique à la détection de translocations par SNG dans les sarcomes n'a été repérée. Toutefois, des recommandations concernant les analyses moléculaires dans le diagnostic des sarcomes ont été abordées par des organisations savantes.

8.1. National Comprehensive Cancer Network (NCCN)

Selon le NCCN, la méthode de référence pour le diagnostic des sarcomes des tissus mous se base sur l'examen microscopique de coupes histologiques afin d'établir un diagnostic morphologique de la tumeur [Von Mehren *et al.*, 2016]. L'association reconnaît l'utilité de techniques complémentaires permettant de conforter le diagnostic morphologique (y compris l'immunohistochimie, la cytogénétique, la microscopie électronique et les analyses moléculaires génétiques). Les résultats des analyses devraient toujours être interprétés selon le contexte clinique et les caractéristiques pathologiques du patient. Pour cette raison, le

diagnostic de sarcome devrait être établi par un pathologiste ayant accès à ces analyses supplémentaires.

8.2. European Society for Medical Oncology (ESMO)

Sarcomes des tissus mous et viscéraux

L'ESMO considère également que le diagnostic pathologique des sarcomes des tissus mous se base d'abord sur l'examen morphologique et immunohistochimique [Casali *et al.*, 2018]. Il devrait toutefois être accompagné d'analyses moléculaires lorsque :

- le diagnostic histologique spécifique est douteux;
- la présentation clinique est atypique;
- les résultats des analyses moléculaires peuvent procurer une valeur pronostique et/ou prédictive.

L'ESMO encourage les laboratoires qui offrent les analyses moléculaires à participer à des programmes externes d'assurance de la qualité.

8.3. British Sarcoma Group (BSG)

Sarcomes des tissus mous

Selon le groupe de travail BSG, le diagnostic pathologique des sarcomes des tissus mous repose sur la morphologie et l'immunohistochimie [Dangoor *et al.*, 2016]. Il devrait être complété de plus en plus à la pathologie moléculaire pour confirmer les diagnostics caractérisés par des anomalies génétiques spécifiques telles que des mutations d'activation, des translocations chromosomiques ou des amplifications chromosomiques, à l'aide de techniques telles que le FISH et la RT-PCR. Le diagnostic moléculaire peut être particulièrement utile lorsque la présentation pathologique clinique est atypique ou que le diagnostic histologique est douteux.

Sarcomes osseux

Le groupe de travail BSG recommande une confirmation moléculaire génétique de translocation pour le sarcome d'Ewing, particulièrement si la présentation clinico-pathologique est atypique ou que le diagnostic basé sur l'histologie est douteux [Gerrand *et al.*, 2016]. Un laboratoire de référence pour le diagnostic du sarcome d'Ewing devrait posséder la technologie de FISH et de RT-PCR et participer à un programme externe d'assurance qualité.

8.4. Le Groupe espagnol de recherche en sarcomes (GEIS)

L'utilisation de techniques moléculaires n'est pas nécessaire pour le diagnostic de tous les cas de sarcomes [Garcia del Muro *et al.*, 2016]. Les analyses moléculaires devraient être réalisées surtout lorsque :

- le diagnostic histologique spécifique est douteux;
- la présentation clinico-pathologique est atypique;
- il peut y avoir une pertinence pronostique ou prédictive.

Dans le cas de sarcome des tissus mous, le but de l'étude moléculaire est de détecter la présence de translocations chromosomiques et des réarrangements géniques ou fusions par RT-PCR ou par FISH.

8.5. Le Forum dermatologique européen (EDF), l'Association européenne de dermato-oncologie (EADO) et l'Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer (EORTC)

Recommandations pour le diagnostic du dermatofibrosarcome

Un consensus d'associations recommande que tous les cas présumés de dermatofibrosarcome protuberans soient confirmés par les marquages immunohistochimiques appropriés (CD34, facteur XIIIa et stromelysine-3) [Saiag *et al.*, 2015]. Selon ce groupe, la détection de translocations chromosomiques et de transcrits de fusions géniques par FISH et par RT-PCR à partir d'échantillons de tissus FFPE est utile pour confirmer les cas de diagnostics difficiles.

9. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Analyse des translocations des sarcomes des tissus mous et osseux par SNG

La recommandation de l'INESSS

- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Introduction conditionnelle de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'INESSS reconnaît l'utilité clinique de cette analyse qui a le potentiel d'apporter une précision diagnostique dans un contexte de tumeurs complexes difficiles à classer. Il reconnaît également un gain potentiel d'efficacité permettant de raccourcir le temps requis pour obtenir un diagnostic final.
- ✓ Étant donné l'ampleur du panel de gènes compris dans l'analyse, l'INESSS recommande de rapporter uniquement les résultats de translocations jugés pertinents pour le diagnostic établi par le pathologiste.
- ✓ Les données de validation analytique ont été jugées suffisantes.

ANNEXE A

Algorithme de traitement des échantillons cliniques proposé par le demandeur

Le demandeur précise que l'algorithme proposé est basé sur les recommandations de l'ESMO et du NCCN [Casali *et al.*, 2018; Von Mehren *et al.*, 2016].

Étape 1 : Réception et révision de la demande d'envoi d'analyse moléculaire

Toute demande accompagnée d'un rapport de pathologie complété sera acceptée s'il est jugé justifié de rechercher une translocation chromosomique par technologie SNG, dans le but de confirmer un diagnostic présomptif de sarcome associé à une translocation chromosomique ou d'y exclure d'un diagnostic différentiel.

Étape 2 : Réception du spécimen et révision du bloc de tissu paraffiné ou tissu frais

Dans un premier temps, une coupe du bloc de tissu reçu sera révisée par un pathologiste afin de confirmer et quantifier globalement le pourcentage de tissu sarcomateux présent. Si le spécimen est jugé inadéquat, la poursuite de l'analyse moléculaire sera avortée et une demande de nouveau spécimen sera envoyée au requérant. Si le spécimen est jugé adéquat, les coupes en ruban seront effectuées par le pathologiste.

Étape 3 : Extraction de l'ARN et génération de la librairie grâce au panel de fusion ARN TruSight^{MC} d'Illumina

Durant cette étape, la qualité de l'ARN extrait sera analysée et, advenant un échantillon sous-optimal, l'étape d'extraction d'ARN sera répétée.

Étape 4 : Recherche de la présence de translocation par SNG à partir de la librairie générée à l'étape 3

Étape 5 : Interprétation des résultats

La détection des fusions s'effectuera à l'aide des outils bio-informatiques Local Run Manager d'Illumina et JAFFA. De plus, la confirmation des fusions sera effectuée manuellement à l'aide du logiciel BLAST. Finalement, l'association entre la fusion trouvée et les fusions connues comme étant liées aux cas de sarcomes sera effectuée grâce à une recherche dans les bases de données spécifiques.

Étape 6 : Validation des résultats

La qualité de l'analyse sera validée par l'utilisation concomitante d'un algorithme de contrôle de qualité (voir figure 2). Si le spécimen analysé remplit les critères définis de qualité, toute fusion détectée sera donc considérée comme valide. Si le spécimen analysé ne remplit pas les critères de qualité définis, toute fusion sera donc invalidée et l'analyse aura conséquemment échoué.

De plus, durant la période d'implantation et de validation de cette nouvelle technologie, une étape supplémentaire de validation serait effectuée par la confirmation de toute fusion (attendue ou nouvelle) exécutée par une méthode alternative (RT-PCR).

Étape 7 : En présence de concordance, délivrance et validation du rapport final

Dans le cas de la détection d'une translocation connue :

Le résultat du transcrit de fusion apparaîtra sur le rapport d'analyse. Celui-ci sera accompagné d'une interprétation clinique qui énoncera que la présence de la translocation détectée permet d'appuyer un diagnostic d'un sous-type de sarcome. Prenons pour exemple la translocation *EWSR1-ATF1*; sa présence peut appuyer un diagnostic de sarcome à cellules claires, d'histiocytome fibreux angiomatoïde ou de myoépithéliome. Ce résultat serait donc à interpréter à la lumière de l'analyse morphologique et immunohistochimique de même que selon le contexte clinique.

Dans le cas de la détection d'une translocation inconnue :

L'interprétation clinique va dépendre du type de translocation découverte. Dans le cas d'un nouveau partenaire d'un gène déjà connu pour être réarrangé dans les sarcomes (par exemple, *EWSR1*), le résultat du transcrit de fusion apparaîtra sur le rapport d'analyse avec une mention spéciale. Celui-ci indiquera la découverte d'une nouvelle translocation avec un gène connu pour être réarrangé dans certains sous-types de sarcomes, mais avec un partenaire inédit. Ce résultat sera donc à interpréter à la lumière de l'analyse morphologique et immunohistochimique de même que le contexte clinique.

Dans le cas d'une découverte de translocation impliquant deux gènes inconnus pour être réarrangés en sarcome, le résultat du transcrit de fusion n'apparaîtra pas dans le rapport. Il serait plutôt mentionné dans le rapport, qu'aucune des translocations connues en sarcome et couvertes par le panel n'a été documentée. Ces découvertes inédites seront colligées et confrontées de façon périodique à la littérature. Si, dans les années qui suivent, certaines de ces nouvelles translocations sont validées, un addendum au rapport original émis sera alors envoyé au requérant.

Dans le cas d'absence de détection d'une translocation connue :

Durant la période d'implantation et de validation de cette analyse, nous demanderons à ce que tout échantillon présentant une absence de détection de fusion par SNG soit testé par une approche conventionnelle de RT-PCR par les centres externes offrant l'analyse de la fusion suspectée (Hôtel-Dieu de Québec ou Hôpital Sainte-Justine) afin d'éliminer les faux-négatifs.

L'énoncé d'absence de translocation détectable sera accompagné d'un énoncé sur la qualité du spécimen analysé, de même que la conformité aux standards de qualité pour l'échantillon analysé.

En aucun temps l'absence de translocation ne permettra de confirmer le diagnostic d'un sous-type particulier de sarcome. Toutefois, cela sera toujours à corroborer avec l'ensemble des données morphologiques, immunohistochimiques et cliniques.

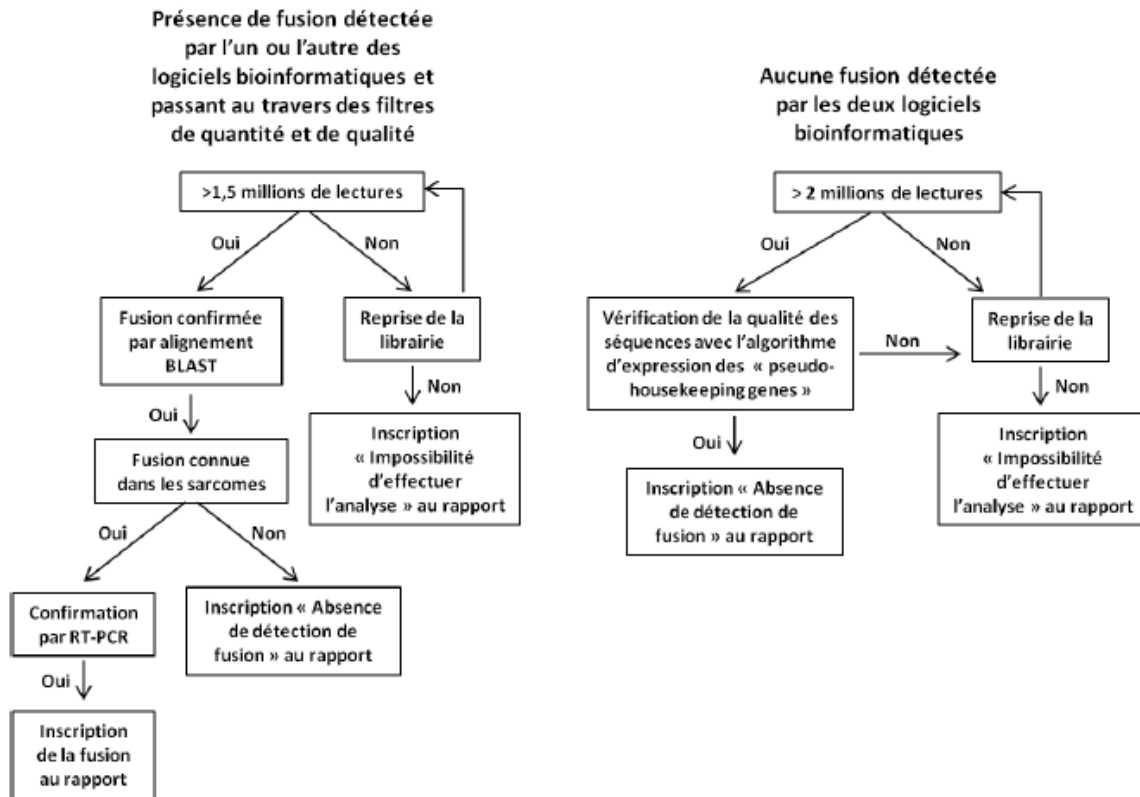


Figure 2 Algorithme de prise de décisions basé sur les analyses bio-informatiques

ANNEXE B

Principales translocations associées aux sarcomes

SOUS-TYPE	FUSION
Rhabdomyosarcome alvéolaire	PAX3-FOXO1, PAX7-FOXO1, PAX3-NCOA1, PAX3-AFX
Sarcome alvéolaire des parties molles	TFE3-ASPSCR1*
Sarcome avec réarrangement <i>BCOR</i>	BCOR-CCNB3, BCOR-MAML3, ZC3H7B-BCOR
Sarcome avec réarrangement <i>CIC</i>	CIC-DUX4, CIC-FOXO4
Sarcome à cellules claires	EWSR1-ATF1*, CREB1-EWSR1
Tumeur desmoplastique à cellules rondes	EWSR1-WT1
Dermatofibrosarcome protuberans	COL1A1-PDGFB
Sarcome du stroma endométrial de bas grade	JAZF1-SUZ12, PHF1-JAZF1, EPC1-PHF1, MEAF6-PHF1, MBTD1-CXorf67
Sarcome du stroma endométrial de haut grade	YWHAE-NUTM2, ZC3H7B-BCOR
Hémangioendothéliome épithélioïde	WWTR1-CAMTA1, YAP1-TFE3
Sarcome d'Ewing	EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-FEV, EWSR1-ETV1, EWSR1-E1AF, EWSR1-ZSG, FUS-ERG*, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV4, EWSR1-POU5F1, EWSR1-PATZ1, EWSR1-SP3, EWSR1-NFATC2, FUS-FEV, BRD4-NUT*
Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique	EWSR1-NR4A3, TAF2N-NR4A3, TCF12-NR4A3, TFG-NR4A3, RBP56-NR4A3
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	TPM3-ALK*, TPM4-ALK, CLTC-ALK*, RANBP2-ALK, ATIC-ALK*, CARS-ALK, SEC31L1-ALK, PPFIBP1-ALK, TFG-ROS1, YWHAE-ROS1, TGFB3-MGEA5
Sarcome fibromyxoïde de bas grade	FUS-CREB3L2, FUS-CREB3L1
Chondrosarcome mésenchymateux	HEY1-NCOA2
Liposarcome myxoïde	<i>FUS-DDIT3, EWSR1-DDIT3</i>
Hémangioendothéliome pseudomyogénique	SERPINE1-FOSB
Histiocytome fibreux angiomatoïde	FUS-ATF1, EWSR1-ATF1*, EWSR1-CREB1*
Myoépithéliome	EWSR1-POU5F1, EWSR1-ZNF444, EWSR1-PBX1
Fibrosarcome épithélioïde sclérosant	FUS-CREB3L2, EWSR1-CREB3L1, FUS-CREB3L1
Fibrosarcome infantile	ETV6-NTRK3*
Tumeur solitaire fibreuse	NAB2-STAT6
Sarcome synovial	SS18-SSX1/SSX2/SSX4
Sarcome myxoïde pulmonaire primaire	EWSR1-CREB1

Adapté de Al-Zaid *et al.*, 2017 et Schaefer *et al.*, 2018.

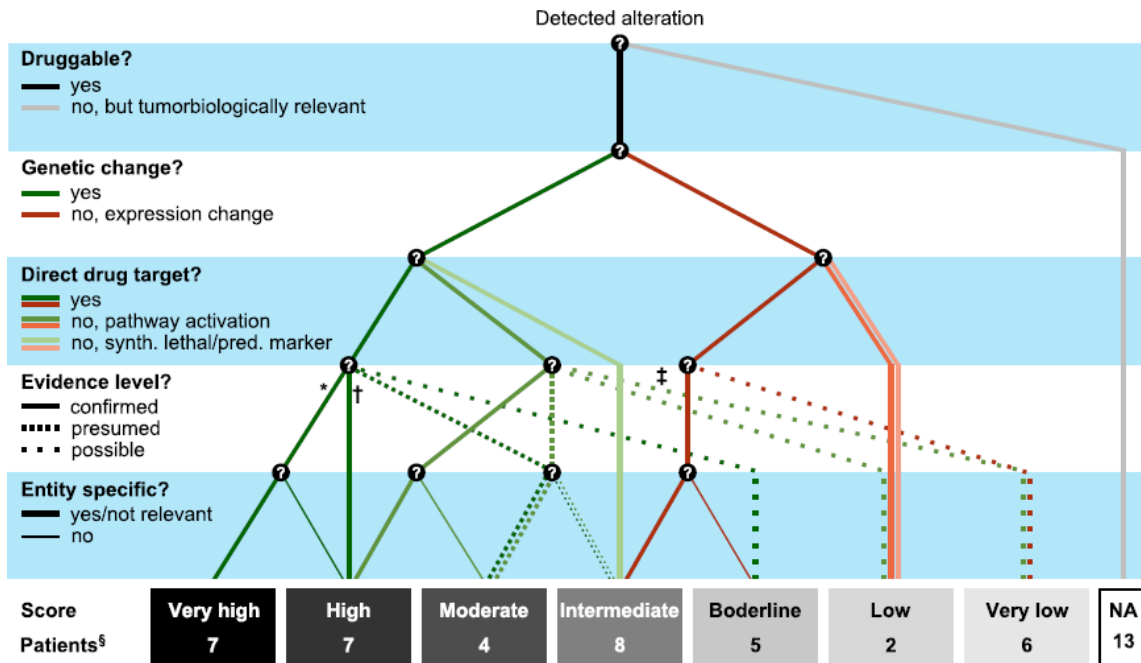
* Ces fusions sont observées dans plusieurs types histologiques de tumeurs et ne sont donc pas spécifiques à un certain type de tumeur ni même à un sarcome.

ANNEXE C

Caractérisation des cibles moléculaires actionnables ou à prioriser selon les études

ÉTUDE	ANOMALIE ACTIONNABLE
Lucchesi <i>et al.</i> , 2018	1) Anomalies associées à des médicaments anticancers approuvés. 2) Biomarqueurs de soins standards prédicteurs de réponse à des médicaments non approuvés pour le traitement de sarcomes. 3) Anomalies associées à des évidences cliniques probantes de valeur prédictive (sans être un biomarqueur ou un médicament de soins standards approuvé). 4) Anomalie associée à des évidences biologiques probantes de valeur prédictive (sans être un biomarqueur ou un médicament de soins standards approuvé).
Harttrampf <i>et al.</i> , 2017	Une anomalie actionnable réfère à une anomalie moléculaire ou un sentier de signalisation dans la tumeur du patient et/ou une analyse germinale qui pourrait théoriquement être ciblée par un médicament approuvé ou un agent (dans toute phase de développement clinique) agissant de manière directe ou indirecte sur le sentier impliqué.
Cote <i>et al.</i> , 2018	Les anomalies testables ou actionnables ont été définies comme celles qui pourraient être acceptables à l'admissibilité dans une étude clinique récente ou en cours.
Pincez <i>et al.</i> , 2017	Anomalie moléculaire dans un gène pathogénique (ou présumément pathogénique) pouvant être ciblé.
Oberg <i>et al.</i> , 2016	1) Un médicament approuvé par la FDA ou un médicament expérimental, capable d'inhiber la cible ou des cibles en aval dans le sentier de signalisation, était offert. 2) Il y a des évidences précliniques qui appuient la possibilité de cibler efficacement la fonction anormale du gène muté et/ou qui appuient la possibilité d'un bénéfice clinique. 3) De l'information est donnée sur le dosage approprié selon l'âge.
Chang <i>et al.</i> , 2016	1) Une mutation de la lignée germinale, y compris une mutation non-sens ou une insertion-délétion avec un changement de cadre de lecture, d'un gène consensus de cancer ou pathogénique, ou probablement pathogénique, selon le American College of Medical Genetics (ACMG). 2) Les anomalies génomiques qui ont mené à un changement du diagnostic du patient. 3) Un événement somatique (y compris un changement de nucléotide unique, une insertion-délétion, une amplification, une délétion ou un gène de fusion) qui peut être ciblé ou pour lequel le patient peut être traité avec un médicament approuvé par la FDA ou dans le contexte d'un essai clinique selon les critères NCI-adult MATCH-Criteria.
Mody <i>et al.</i> , 2015	Toute anomalie génomique révélée par l'analyse de séquençage pouvant mener à 1) un changement de la prise en charge du patient par la détection d'une anomalie moléculaire pouvant être ciblée, 2) un changement du diagnostic ou de la stratification pronostique, ou 3) la détection d'anomalies germinales liées au cancer, procurant de l'information concernant les risques potentiels de divers cancers chez les patients ou les apparentés.

Abréviation : FDA : De l'anglais *Food and Drug Administration*.



Source : Worst *et al.*, 2016.

Figure 2 Algorithme de priorisation des cibles thérapeutiques chez des patients pédiatriques à risque élevé de récurrence ou de tumeurs réfractaires

Pour l'étude de Worst et ses collaborateurs [2016], un panel d'expert a priorisé les cibles potentielles à transmettre au médecin traitant pour la prise de décision clinique sur une base individuelle.

Le score de priorisation des patients se basait sur l'existence d'un médicament associé à l'anomalie génomique détectée, la présence d'un changement génétique, l'existence d'un médicament ciblant directement l'anomalie génomique, le niveau de preuves et la spécificité.

ANNEXE D

Description des études retenues

Lam [2018]	Période de recherche : 2004 à 2015 (14 échantillons) Janvier 2016 à septembre 2017 (67 échantillons) Nombre de patients : 81 échantillons patients Buts : Évaluer l'applicabilité d'un SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex (<i>AMP-based targeted NGS</i>) pour la détection de translocations dans les tumeurs osseuses et des tissus mous lors du diagnostic de routine. Primaire : Les résultats obtenus par SNG ont ensuite été comparés à ceux obtenus par un FISH conventionnel et par la RT-PCR, et par immunohistochimie lorsque possible.	Population cible : Patients présentant une tumeur osseuse ou des tissus mous. Méthodes : Les résultats de détection de translocations dans des tumeurs osseuses et des tissus mous, obtenus par une méthode de SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex (trousse Archer FusionPlex Sarcoma^{MC}, comprenant un panel de 26 gènes), ont été évalués et comparés aux techniques de FISH et de RT-PCR.	Résultats : - Sur 58 de 81 échantillons (72 %), une analyse moléculaire alternative a été effectuée : ▪ FISH (n = 55); ▪ RT-PCR (n = 1); ▪ FISH et RT-PCR (n = 2) - Dans 16 cas, une analyse d'immunohistochimie a été utilisée afin de procurer de l'information supplémentaire sur la présence ou l'absence de translocations. - Dans les 7 autres cas, aucune analyse supplémentaire n'a pu être effectuée. <u>Cas concordants</u> - Une concordance entre la méthode SNG et une méthode de référence (FISH, RT-PCR ou les deux) a été observée dans 25 cas. - Dans un cas, la technique de SNG a permis d'identifier le gène <i>PBX1</i> comme partenaire de fusion du gène <i>EWSR1</i>, ce qui a mené à changer le diagnostic de sarcome d'Ewing en diagnostic de carcinome myoépithélial. <u>Cas non concordants</u> - Des résultats non concordants entre la méthode de SNG et une méthode de référence (FISH, RT-PCR ou les deux) ont été observés dans 5 cas (4 cas de FISH et 1 cas de RT-PCR). Ces cas ont été analysés par une troisième méthode indépendante. ▪ CAS 1 : L'analyse par SNG a révélé une fusion COL1A1-PDGFB dans un cas soupçonné de dermatofibrosarcome protuberans, pour lequel les
--------------------------	---	--	---

			sondes de FISH commerciales n'avaient pas permis de détecter cette fusion. L'utilisation de nouvelles sondes de FISH et d'amorces de RT-PCR a confirmé les résultats de SNG. ▪ CAS 2 : Dans un cas dont la morphologie et les résultats d'immunohistochimie étaient indicatifs d'un sarcome d'Ewing, mais dont les résultats du FISH avec des sondes de point de bris pour EWSR1 étaient difficiles à interpréter, le SNG a montré la présence d'une fusion EWSR1-ERG confirmant le diagnostic. Subséquemment, la synthèse de nouvelles sondes a permis la confirmation de la fusion par FISH. De plus, l'analyse par immunohistochimie était positive pour ERG. ▪ CAS 3 : Un cas présumé de sarcome d'Ewing négatif par FISH a été confirmé en SNG par la détection de la fusion EWSR1-FL1. L'utilisation de sondes rapprochées pour EWSR1 et de sondes de colocalisation ont permis de confirmer les résultats du SNG dans un deuxième temps. ▪ CAS 4 : Dans un cas dont la morphologie et l'analyse immunohistochimique étaient indicatives d'un sarcome d'Ewing et pour lequel un bris du gène EWSR1 avait été détecté par FISH, l'analyse par la RT-PCR demeurait négative. L'analyse par SNG a révélé une fusion EWSR1-FL1 plus rare (fusion de l'exon 10 du gène EWSR1 à l'exon 5 du gène FL1). La synthèse de nouvelles amorces basées sur la séquence de la fusion détectée par SNG a permis de confirmer la présence de la fusion par RT-PCR et par un séquençage de Sanger ensuite. ▪ CAS 5 : Chez une patiente dont un chondrosarcome myxoïde extrasquelettique et un carcinome myoépithélial faisaient partie du diagnostic différentiel, aucune fusion n'a été détectée par SNG, alors qu'une fusion impliquant le gène EWSR1 avait été révélée par FISH. - Dans 5 des 11 cas où l'analyse par SNG n'a détecté aucune fusion, une fusion détectée par FISH
--	--	--	---

			suggère que, pour les échantillons de faible qualité, l'utilisation du FISH pourrait être préférable. Conclusions : Les auteurs ont observé un taux d'échec de 14 % associé à l'approche SNG ciblée utilisée, pouvant s'expliquer par le processus de décalcification ou de fixation de certains échantillons. De plus, puisque la technique utilise des amplicons de taille relativement petite, il est difficile de faire la distinction entre des gènes homologues avec un degré d'identité élevé. Les auteurs ont conclu que l'analyse de SNG ciblé avec une PCR ancrée multiplex démontrerait des résultats supérieurs aux techniques de FISH et de RT-PCR tant que tous les critères de qualité sont remplis dans les cas négatifs pour une fusion.
Italiano [2016] France Étude observationnelle prospective multicentrique	Période de recherche : 22 juin 2009 au 30 octobre 2012 Nombre de patients : 384 Buts : Primaire : Évaluer les effets cliniques d'une implantation systématique d'analyses moléculaires pour améliorer les erreurs diagnostiques de sarcomes. Secondaire : Évaluer la différence des effets de la	Critères d'inclusion : - Disponibilité d'un échantillon de tissu à partir d'une biopsie ou d'une résection chirurgicale; - Suspicion de dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand, de liposarcome dédifférencié, de sarcome d'Ewing, de sarcome synovial, de rhabdomyosarcome alvéolaire ou de liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes. Le diagnostic a été établi selon la classification des tumeurs de l'Organisation mondiale de la Santé; - Un examen par un pathologiste spécialisé en sarcomes;	Résultats : <u>Diagnostic :</u> - Le diagnostic a été catégorisé comme certain par le pathologiste dans 166/384 cas (43 %), et une anomalie moléculaire spécifique a été détectée dans 157/166 (94 %) cas avec un diagnostic morphologique considéré comme certain. Dans 9 de ces cas, le résultat de l'analyse moléculaire contredisait le diagnostic du pathologiste. - Le diagnostic a été catégorisé comme probable dans 129/384 (34 %) des cas. L'analyse moléculaire était négative dans 38/129 (29 %) des cas pour lesquels le diagnostic final a été modifié et 35 d'entre eux ont été corrigés. Dans 2 cas, le pathologiste a maintenu le diagnostic de l'analyse histologique en se basant sur la présentation typique de ces tumeurs. - Des résultats préliminaires suggèrent que la sensibilité et la spécificité ne sont pas très différentes entre les échantillons provenant de tissus congelés et fixés au formaldéhyde et paraffinés. Seule une légère

	détection d'anomalies génétiques sur le diagnostic de sarcomes entre les échantillons provenant de tissus congelés et fixés au formaldéhyde et enrobés de paraffine. Contexte : Des progrès dans le domaine de la génétique moléculaire des sarcomes ont permis l'identification d'anomalies spécifiques à certains types de sarcomes.	- Disponibilité de tissu congelé (hormis un patient de la cohorte 1 puisque l'analyse de détection de CD34 par immunohistochimie requerrait un échantillon fixé au formaldéhyde et enrobé de paraffine); - Informations sur le patient et accès au dossier; - Un diagnostic final a été établi en fonction du contexte clinique, de l'histologie, de l'immunohistochimie et des résultats des analyses moléculaires; - La méthode de référence pour le diagnostic moléculaire du dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand était le marquage de CD34 en immunohistochimie, l'hybridation génomique comparative pour le liposarcome différencié et la RT-PCR pour le sarcome d'Ewing, le sarcome synovial, le rhabdomyosarcome alvéolaire et le liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes. Les méthodes innovatives étaient le FISH, la détection de translocations (toutes les cohortes sauf la cohorte 2), l'amplification de <i>MDM2</i> (cohorte 2), la PCR quantitative (cohorte 2) et la RT-PCR (cohortes 3 à 6).	différence a été notée dans le cas des sarcomes d'Ewing (cohorte 3). - Dans 89/384 (23 %) des cas, le diagnostic a été catégorisé comme possible. L'analyse moléculaire était négative dans 69/89 (78 %) des cas. - Le diagnostic a été corrigé suite à l'examen des résultats des analyses moléculaires effectuées sur 53/384 (13,8 %) patients. - La correction du diagnostic initial a eu une influence sur l'évaluation pronostique ou la prise en charge du patient dans 45/53 (84,5 %) cas. Conclusions : Des analyses moléculaires devraient être effectuées de façon systématique pour la précision diagnostique des sarcomes et pour une prise en charge adéquate, et ce, même lorsque le diagnostic histologique est établi par un pathologiste expert dans le domaine. Les résultats de l'étude montrent que, même lorsque les sarcomes sont évalués par des pathologistes experts, les analyses moléculaires génétiques peuvent procurer des données supplémentaires et indépendantes. Les effets des résultats des analyses génétiques sur la stratégie de traitement étaient très importants. Les résultats des analyses génétiques doivent être interprétés et considérés avec la morphologie de la tumeur. Aucune des analyses moléculaires ne possède seule une spécificité absolue. Les résultats de l'étude montrent les limites de l'approche purement morphologique qui peut occasionner une erreur de diagnostic dans certains cas (jusqu'à 23 % des cas). Limites :
--	--	---	--

		Population cible : Patient ayant été biopsié ou ayant subi une résection chirurgicale pour un diagnostic (ou suspicion) de sarcome et ayant été référé par un des 32 centres du <i>French Sarcoma Group/Reference Network in Pathology of Sarcomas</i>. Méthodes : 6 cohortes : 1- dermatofibrosarcome de Darier-Ferrand (n = 50) 2- liposarcome dédifférencié (n = 30) 3- sarcome d'Ewing (n = 112) 4- sarcome synovial (n = 97) 5- rhabdomyosarcome alvéolaire (n = 46) 6- liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes (n = 49) - Les biopsies ont été examinées par un pathologiste spécialisé en sarcomes, qui a établi un diagnostic primaire accompagné d'un ou de deux diagnostics différentiels (basé uniquement sur l'examen histologique). - Une analyse moléculaire a été effectuée par FISH (pour chacun des cas sur des tissus enrobés de paraffine), par hybridation génomique	Une amélioration du diagnostic ne garantit pas une prédiction plus fiable de la survie que celle établie uniquement sur le diagnostic histologique. Cet aspect doit être évalué au moyen d'une étude randomisée comparant les 2 méthodes diagnostiques (examen histologique et examen histologique avec analyses génétiques). Ce type d'étude serait difficile à implanter. La classification basée sur la morphologie (certain, probable ou possible), avant les analyses moléculaires, peut être subjective. Toutefois, il s'agit d'une classification pratique du degré de certitude du diagnostic, utilisée dans la pratique clinique et reflétant la difficulté de classification d'un histotype donné.
--	--	--	--

		comparative et par PCR quantitative (cohorte 2) ou RT-PCR (sur des échantillons de tissus congelés ou fixés enrobés de paraffine, cohorte 3 à 6). - Un diagnostic final a été établi selon les résultats des analyses moléculaires. - Les effets cliniques des corrections diagnostiques ont été évalués par un groupe d'experts.	
Lucchesi [2018] France Étude transversale	Nombre de patients : 584 But : - Caractériser les modifications génomiques pouvant être ciblées chez les patients atteints de sarcome des tissus mous. - Déterminer comment les cibles thérapeutiques identifiées dans le génome peuvent être utilisées pour guider le traitement personnalisé et ciblé des patients atteints de sarcome des tissus mous.	Population cible : Les patients atteints de sarcome des tissus mous. Exclusions : Tumeur desmoïde/fibromatose, myoépithéliome des tissus mous, sarcome de cellules dendritiques histiocytaires, sarcome de cellules dendritiques folliculaires, tumeur myofibroblastique inflammatoire, tumeur fibromyxoïde ossifiante, hémangiome, tumeur ténosynoviale à cellules géantes et myofibrome. Méthodes : Les sarcomes ont été divisés en 3 catégories : - Sarcomes à génomes complexes (anomalies	Résultats : Caractéristiques des patients (sarcomes) : - 294 (50,3 %) hommes; - 290 (49,7 %) femmes; - Âge médian de 56 ans (18 à 89 ans); - Caryotype complexe : 331 (57 %); - Sarcomes associés aux translocations : 144 (25 %); - Autres (mutation inactivatrice, amplicon simple) : 112 (19 %); - Le groupe « autres sarcomes » est le groupe qui compte le plus de modifications et celui des sarcomes associés aux translocations comptait le moins de mutations (90,8 % contre 77,8 %, $p < 0,10$ par test du χ^2). Résultats du séquençage de nouvelle génération : - 2 697 modifications relevées dans 451 gènes (1 154 substitutions, 765 amplifications, 364 courtes insertions ou délétions et variantes d'épissage,

		caryotypiques complexes sans patron spécifique); - Sarcomes associés aux translocations résultant en transcrit de fusion oncogénique; - Autres sarcomes : sarcomes sans mutations oncogéniques spécifiques ou amplifications récurrentes. Les modifications génomiques ont été classées ainsi : - Les modifications associées à des médicaments anticancers en sarcomes; - Des biomarqueurs prédicteurs de réponse aux médicaments non approuvés pour le traitement des patients avec sarcomes avec les soins standards; - Des modifications associées à des preuves cliniques convaincantes de valeur prédictive, mais n'étant pas considérées, comme un biomarqueur ou un médicament de soins standards; - Modifications associées à des preuves biologiques convaincantes de valeur prédictive, mais n'étant pas considérées comme un biomarqueur ou un	346 délétions homozygotes et 68 réarrangements géniques); - Médiane de modification génomique : 4 (1 à 53) par cas. Anomalies génomiques pouvant être ciblées : Au moins une anomalie génomique pouvant être ciblée a été détectée dans 239 cas (41 %). Un nombre significativement plus élevé d'anomalies génomiques pouvant être ciblées a été observé dans les sarcomes à génome complexe ou autre, comparativement aux sarcomes associés aux translocations (complexe : n = 131, autre : n = 89, translocations : n = 19, p < 0,001 par Chi²). - Le nombre de translocations pouvant être ciblées dans les 10 principaux sous-types histologiques de sarcomes des tissus mous est de 2/308 (0,65 %). - Au moins 1 anomalie cliniquement pertinente susceptible de guider la décision d'un traitement ciblé a été relevée dans 239 de 585 cas (41 %) : ▪ 132/331 (40 %) sarcomes à caryotype complexe; ▪ 19/144 (13 %) des sarcomes associés aux translocations; ▪ 89/109 (82 %) des autres sarcomes; ▪ test de Chi² p < 0,001. Conclusions : Jusqu'à 41 % des sarcomes des tissus mous possédait au moins une anomalie génomique pertinente cliniquement avec un potentiel d'influencer et de personnaliser le traitement. Le profilage génomique compréhensif peut déterminer de nouveaux paradigmes de traitement et améliorer la stratification pronostique des patients présentant un sarcome des tissus mous.
--	--	--	---

		médicament de soins standards. Paramètres : Présence d'une modification génomique pouvant être ciblée dans les sarcomes des tissus mous.	
Neuville [2013] Europe Étude de cohorte multicentrique	Période de recherche : 2 ans (2005-2006 pour Rhône Alpes et 2006-2007 pour Aquitaine et Veneto). Nombre de patients : 763 sarcomes. But : Évaluer l'impact diagnostic des analyses moléculaires de sarcomes dans une série épidémiologique (tous les nouveaux cas de sarcomes diagnostiqués dans une population et une période définie).	Critères d'inclusion : 1) Tous les nouveaux cas de sarcome des tissus mous ou viscéraux selon la classification de l'Organisation mondiale de la Santé de 2012 (y compris les sarcomes et les tumeurs malignes intermédiaires à potentiel métastatique, tumeurs lipomateuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés tels que le dermatofibrosarcome protubérans ou le syndrome de Kaposi et les tumeurs stromales gastro-intestinales [TSGI]). 2) Les cas diagnostiqués comme des cancers primaires au cours d'une période d'étude de 2 ans, même lorsqu'une métastase distale était présente au moment du diagnostic initial. 3) Les cas impliquant des patients des deux sexes et de tout âge, résidant dans une des 3 régions suivantes : Rhône Alpes (France), Aquitaine (France) ou Veneto	Résultats : Il y avait 286 sur 1 484 cas de translocations soupçonnés (19 %). Une analyse moléculaire a été réalisée sur 248 cas, dont 153 étaient positifs (62 %), 83 négatifs (33 %) et 12 ont conduit à des résultats non interprétables (5 %). <u>Translocations :</u> Dans 116 cas, le diagnostic était considéré comme certain d'après le contexte clinique, l'histologie et les résultats d'immunohistochimie, avant d'entamer l'analyse moléculaire. Ces cas étaient principalement des dermatofibrosarcomes protubérans (86 cas), des liposarcomes myxoïdes ou à cellules rondes (18 cas) ou des tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes. - Les résultats des analyses moléculaires étaient positifs dans 72 cas sur 84 (86 %) lorsque le diagnostic initial était certain. - Lorsque le diagnostic initial était considéré comme probable, l'analyse moléculaire confirmait 62 cas sur 75, mais éliminait 12 cas (16 %, pour lesquels le diagnostic final était modifié). - L'analyse moléculaire a permis le diagnostic d'un sarcome avec translocation spécifique dans 19 cas sur 89 (21 %) lorsque le diagnostic initial d'un sarcome avec translocation était considéré comme possible seulement.

		(Italie) (couvre une population de 13 millions). Exclusions : Tumeurs osseuses primaires. Méthodes : Un diagnostic prémoléculaire a été posé dans chacun des cas suspectés de lésion génétique spécifique, d'après le contexte clinique, histologique et l'immunohistochimie selon 3 niveaux de certitude : - certain : lorsqu'un seul diagnostic est possible - probable : premier diagnostic envisagé, mais avec un diagnostic différentiel possible pour une autre tumeur. - possible : lorsque le diagnostic n'était pas le premier considéré. Le diagnostic final était basé sur le contexte clinique, histologique et immunohistochimique, et sur les résultats des analyses moléculaires, le cas échéant. <u>Analyses moléculaires :</u> Sur des tissus enrobés de paraffine ou frais et congelés. TSGI : mutations de KIT et de PDGFRA Translocations (RT-PCR et/ou FISH) : tumeur neuroectodermique	- Dans cette série, une analyse moléculaire était nécessaire dans 31 cas (12 % des cas avec analyse moléculaire) pour atteindre le bon diagnostic de ces sarcomes avec translocation suspectée. Conclusions : Cette étude démontre l'impact des analyses moléculaires sur le diagnostic final de sarcomes et favorise ce type d'analyse sur toute tumeur soupçonnée de comporter une anomalie génomique spécifique et pour laquelle le diagnostic est incertain. Limites : - Les analyses moléculaires ont un intérêt limité pour les TSGI puisque DOG1 sert de marqueur. La recherche de mutation est utile pour prédire la réponse à l'imatinib puisque des mutations comme PDGFRA D842V procurent une résistance à cet agent, selon les lignes directrices de l'ESMO. - 5 à 10 % des analyses moléculaires étaient non interprétables. En outre, le fait qu'un résultat soit négatif à l'analyse moléculaire ne permet pas d'infirmier le diagnostic.
--	--	--	---

		périphérique, sarcome synovial, liposarcome à cellules rondes ou myxoïdes, rhabdomyosarcome alvéolaire, sarcome fibromyxoïde de bas grade, tumeur desmoplastique à petites cellules rondes et dermatofibrosarcome protuberans (FISH seulement). Amplification de MDM2 pour les tumeurs lipomateuses atypiques ou liposarcomes bien différenciés ou dédifférenciés (FISH).	
Harttrampf [2017] France Étude clinique prospective unicentrique non randomisée (MOSCAT-01, NCT01566019)	Période de recherche : Décembre 2012 à janvier 2016 Nombre de patients : 73 But : Caractériser les anomalies génomiques dans les tumeurs solides récurrentes ou réfractaires de patients pédiatriques afin de sélectionner un traitement ciblé. Montrer que l'application clinique d'une approche génomique à haut débit mène à une amélioration de la situation clinique des patients atteints de cancer métastatique.	Critères d'inclusion : - Enfants âgés de plus de 6 mois; - Patients ayant reçu au moins une première ligne de traitement; - Espérance de vie de plus de 3 mois; - Échelle de performance du <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> (ECOG) de 0/1 ou de l'échelle de jeu de Lansky ≥ 70 %; - Fonctionnement adéquat de la moelle osseuse et des organes. Population cible : Les patients pédiatriques présentant une tumeur solide incurable, récurrente ou résistante.	Résultats : <u>Données démographiques :</u> - Âge médian de 10,9 ans (0,8 à 24,3 ans), 11 patients (15,1 %) étaient âgés de 18 ans ou plus au moment de l'inscription à l'étude. - La performance médiane était de 90 % à l'échelle de jeu de Lansky et de 0 à l'échelle de l'ECOG. - Les tumeurs impliquaient 25 types différents (37 % des tumeurs du SNC et 63 % des tumeurs solides extra-crâniennes). - Nombre médian de lignes de traitements subis préalablement de 2 (1 à 8). - Temps médian depuis le diagnostic initial : 26,8 mois (2,4 à 153,1 mois). - Temps de réponse médian entre la biopsie et les résultats des analyses moléculaires : 26 jours (ÉI : 19 à 41 jours). - 30 tumeurs sur 73 étaient des sarcomes (14 rhabdomyosarcomes, 6 sarcomes d'Ewing, 4 ostéosarcomes et 7 sarcomes autres). Aucune

		Méthodes : Des échantillons de tissus provenant de biopsie ou de résection de tumeurs primaires ou métastatiques ont été analysés par hybridation génomique comparative, par SNG pour une sélection de 75 gènes, séquençage du génome complet et séquençage de l'ARN (TruSeq Stranded mRNA kit). Un programme de bio-informatique maison a été utilisé pour la détection de fusions. Le pourcentage de cellules cancéreuses des biopsies a été déterminé par un pathologiste expérimenté. Un seuil minimum de $\geq 30\%$ de cellules cancéreuses a été établi pour la poursuite des analyses, mis à part pour le séquençage de panel de gènes ciblés pour lequel l'analyse était réalisée sur les échantillons contenant plus de 10 % de cellules cancéreuses. Les résultats des analyses moléculaires étaient révisés de manière hebdomadaire par une équipe multidisciplinaire comprenant des scientifiques, des généticiens, des pathologistes et des cliniciens, afin de jumeler les patients au traitement ciblé le plus pertinent.	analyse moléculaire n'a été effectuée pour un rhabdomyosarcome congénital. <u>Analyses moléculaires (n = 69) :</u> - Aucune anomalie génomique considérée comme un biomarqueur clairement associé à un bénéfice clinique prouvé d'un traitement enregistré pour la maladie n'a été détectée chez les patients de la cohorte. - Globalement, une anomalie génomique potentiellement actionnable a été détectée par au moins une analyse chez 42 patients sur 69 (60,9 %), dont : ▪ 42,4 % nombre de copies; ▪ 33,3 % mutation; ▪ 14,5 % nombre de copies et mutation; ▪ 26 % plus d'une anomalie actionnable - Sur ces 42 patients, 14 (33,3 %, ou 19,2 % de la population d'étude complète) ont reçu un agent tumoral basé sur les résultats des analyses moléculaires. Cinq de ceux-ci ont démontré une réponse ou une stabilisation prolongée de la maladie. - Une fusion a été détectée ou confirmée chez 12 patients (non seulement des sarcomes). Cela a mené au changement du diagnostic dans 1 cas de gliome (en épépendymome). Parmi ces 12 fusions, 9 ont été détectées dans des sarcomes. - Un patient atteint de sarcome alvéolaire des parties molles caractérisé par la fusion <i>ASPSCR1-TFE3</i> menant à une suractivation de MET, avait déjà subi un traitement avec l'inhibiteur de MET crizotinib avant l'inclusion dans l'étude. Ce patient a cessé le traitement après 3 cycles du fait de sa toxicité. La réponse était une stabilisation de la maladie. * Aucune autre fusion qui aurait été accessible pour un traitement ciblé n'a été détectée.
--	--	--	--

		Paramètres : Une anomalie actionnable a été définie comme l'identification d'une anomalie moléculaire ou d'une atteinte à un sentier de signalisation dans la tumeur du patient et/ou une analyse de mutations germinales qui auraient le potentiel d'être ciblées par un médicament approuvé ou par un agent dans un contexte de recherche à n'importe quelle phase de développement clinique, intervenant de façon directe ou indirecte dans le sentier touché. La priorisation a été basée sur la force des preuves d'une anomalie moléculaire et l'accessibilité au traitement ciblé.	Conclusions : Les événements génétiques ayant un impact sur les cancers et l'accès limité aux agents ciblés à l'intérieur des études cliniques pédiatriques représentent les principaux obstacles.
Mody [2015] États-Unis Étude observationnelle d'une série de cas consécutifs (prospective) unicentrique	Période de recherche : Mai 2012 à octobre 2014 Nombre de patients : 91 But : Évaluer l'utilisation d'une approche clinique intégrative de séquençage et de consultation génétique dans l'évaluation et le traitement d'enfants et de jeunes adultes atteints de cancer.	Population cible : Enfants ou jeunes adultes (25 ans et moins) présentant une récurrence de cancer, un cancer réfractaire ou un cancer rare. Méthodes : Le contenu en cellules cancéreuses a été estimé par des pathologistes préalablement au séquençage. Une équipe multidisciplinaire (oncologistes, généticiens, pathologistes, biologistes, bio-informaticiens, bioéthiciens,	Résultats : <u>Données démographiques :</u> - Âge médian : 11,5 ans (1 à 22 ans). - 81 patients avaient un cancer réfractaire/récurrence au moment de l'inscription, avaient épuisé toutes les options thérapeutiques prouvées et consultaient pour des options thérapeutiques expérimentales. - 21 patients se sont inscrits au moment du diagnostic initial lorsqu'ils présentaient un diagnostic très rare ou une présentation atypique pour le groupe pédiatrique. <u>Analyses moléculaires :</u>

		consultants génétiques, coordonnateurs d'études et experts ad hoc) a interprété et délibéré les résultats de séquençage sur une base hebdomadaire. Paramètres : - La proportion de patients présentant des anomalies génomiques potentiellement actionnables. - Les résultats de la prise en charge basée sur les résultats de séquençage. - L'estimation de la proportion de patients ou de leur famille présentant un risque de nouveau cancer. Une anomalie potentiellement actionnable a été définie comme une modification qui pourrait mener au changement de la prise en charge du patient en procurant une anomalie pouvant être ciblée, à un changement du diagnostic ou à la stratification du risque ou à l'identification de mutations germinales qui pourrait procurer de l'information aux patients ou à leur famille sur le risque de développer un cancer.	- Dans 91 cas (89 %), la qualité et/ou quantité de matériel était suffisante pour effectuer le séquençage, dont 28 cancers hématologiques (31 %) et 63 tumeurs solides (69 %). - Une anomalie génomique potentiellement actionnable a été découverte chez 42 patients (46 %), dont 9 (10 %) présentaient une anomalie germinale significative. - Des anomalies génomiques potentiellement actionnables ont été détectées chez 15 des 28 (54 %) patients atteints de cancer hématologique. - Des anomalies génomiques potentiellement actionnables ont été détectées chez 27 des 63 (43 %) patients pédiatriques présentant une tumeur solide. ▪ Le séquençage a permis de détecter une fusion LMNA-NTRK1 chez une patiente de 3 ans ayant préalablement reçu un diagnostic de myofibromatose infantile, puis de sarcome à cellules fusiformes de haut grade négatif pour la fusion ETV6-NTRK3 (par séquençage) et, enfin, de fibrosarcome infantile par analyse du transcriptome. Cette découverte a mené, non seulement à un changement du diagnostic, mais aussi à un traitement au crizotinib. La patiente a atteint une rémission partielle et a depuis maintenu une réponse favorable au crizotinib pendant une période de plus de 8 mois sans toxicité majeure. ▪ Le séquençage a également permis une correction diagnostique chez une patiente de 4 ans initialement diagnostiquée avec un médulloblastome qui exprimait la fusion PAX3-NCOA2 suggérant plutôt un rhabdomyosarcome. Cette observation a conduit à un changement de la prise en charge. - Des fusions ont été décelées dans 27 % des tumeurs solides avec une prédominance dans les sarcomes.
--	--	--	--

			<u>Résultats du séquençage pour les sarcomes</u> - Les résultats du séquençage ont révélé des anomalies génomiques actionnables dans le cas de 10 sarcomes, dont 4 avec des fusions. Parmi ces fusions : ▪ 2/4 fusions ont conduit à un changement du diagnostic; ▪ 3/4 fusions ont conduit à un changement du traitement; ▪ 2/4 fusions ont conduit à un traitement ciblé (traitement au pazopanib pour une fusion SFPQ-TFE3 d'un PEComa, qui a abouti à une réduction de 90 % de la tumeur sur une période de plus de 16 mois et à un traitement au crizotinib suite à un changement du diagnostic pour un fibrosarcome infantile, inhibiteur de NTRK1, pour une fusion LMNA-NTRK1 qui a conduit à une réduction de 50 % de la masse. Conclusions : L'intégration des données cliniques du séquençage dans la prise en charge est possible; elle a permis de révéler des anomalies génomiques potentiellement actionnables chez 46 % des patients et était associée à une modification du traitement ainsi qu'à la consultation génétique dans une petite proportion des patients. Limites : L'absence d'un groupe contrôle a limité la capacité d'évaluer si la situation clinique s'améliorait chez les patients de l'étude en comparaison des patients traités par les soins standards. Chez certains patients, le séquençage lors d'une récurrence a été réalisé sur le tissu prélevé au moment du diagnostic initial. Cela n'est pas idéal alors que le génome de la tumeur peut évoluer en réponse au traitement.
--	--	--	--

			Le temps de réponse plus long que prévu a limité la capacité de prendre des mesures cliniques chez plusieurs patients.
Chang [2016] États-Unis Étude pilote unicentrique (NCT01109394)	Période de recherche : 2010 à décembre 2014 Nombre de patients : 59 But : Faire une étude clinique génomique multidimensionnelle chez les enfants, adolescents et jeunes adultes atteints de cancer récurrent ou réfractaire, afin de déterminer l'utilité et la faisabilité d'appliquer un traitement ciblé à partir du génome.	Exclusions : Tumeurs du système nerveux central Population cible : Patients présentant une tumeur solide, à l'exclusion des tumeurs du système nerveux central. Méthodes : Séquençage de l'exome complet, séquençage du transcriptome complet, analyse de polymorphisme mononucléotidique par biopuce. Paramètres : Une anomalie génomique actionnable a été définie comme l'identification d'une mutation germinale, un changement du diagnostic ou une mutation somatique (mutation ponctuelle, insertion ou délétion nucléotidique, amplification, délétion ou fusion génique) qui pourrait être ciblée par des médicaments approuvés ou investigués en essais cliniques.	Résultats : <u>Données démographiques :</u> - Âge médian au moment de la biopsie : 15 ans (7 mois à 25 ans) - 20 types de tumeurs solides : 10 (20 %) syndrome d'Ewing et 10 (20 %) neuroblastomes. - 9 cas (15 %) avaient des métastases et 5 (8 %) des cas incluaient des tumeurs séquentielles. <u>Résultats des analyses :</u> - 26 (44 %) des patients avaient des gènes de fusion (la majorité des patients avaient un diagnostic de sarcome). - La détection d'une fusion chez 2 patients a mené à un changement du diagnostic chez ceux-ci (la fusion <i>CIC-FOXO4</i> a amené le changement d'un diagnostic de syndrome d'Ewing en un diagnostic de sarcome similaire au syndrome d'Ewing et la fusion <i>BCOR-CCNB3</i> d'un sarcome à cellules claires du rein à un sarcome non différencié). L'absence de gène de fusion a mené au changement diagnostique d'un histiocytome fibreux de haut grade en un sarcome non différencié. - 30/59 (51 %) des patients présentaient des mutations actionnables, dont 24 (41 %) présentaient une mutation actionnable dans le cadre d'essais cliniques accessibles, 4 (7 %) ont eu une correction diagnostique et 7 (12 %) présentaient une mutation germinale. - Un traitement ciblé a été instauré chez un patient atteint de sarcome myofibroblastique épithélial inflammatoire positif pour la fusion <i>RANBP2-ALK</i> .

			À 8 mois suivant l'instauration d'un traitement au crizotinib, une réponse métabolique et anatomique complète a été observée. La monothérapie a été maintenue sur une période de 6 mois, mais le patient a eu une récurrence et a été transféré à un traitement de ceritinib. Le patient est décédé 2 ans après le début du traitement au crizotinib. Conclusions : Cette étude a permis de démontrer la faisabilité clinique du séquençage de nouvelle génération dans une population diverse de tumeurs pédiatriques solides récurrentes ou réfractaires. L'analyse du génome a le potentiel d'influencer le diagnostic et le traitement chez ces patients. La monothérapie ciblée peut prolonger la survie, mais risque de ne pas permettre la guérison complète, comme observé dans cette étude. Cela souligne l'importance d'une combinaison gène-médicament avec la thérapie conventionnelle.
Worst [2016] Allemagne Étude rétrospective unicentrique	Période de recherche : Nombre de patients : 57 (25 sarcomes, 23 tumeurs cérébrales, 9 tumeurs autres). Assez de tissu ou de contenu tumoral pour 52 patients. But : Déterminer des cibles thérapeutiques individuelles chez des patients pédiatriques exposés à un risque élevé de récurrence ou de tumeurs réfractaires. - Établir une logistique pour une analyse moléculaire en temps	Critères d'inclusion : Enfants, adolescents et jeunes adultes âgés de 1 à 40 ans, atteints de maladie oncologique progressive réfractaire ou avec récurrence (avec un traitement initial selon le protocole du GPOH) ainsi que des indications primaires spécifiques. Méthodes : Séquençage de l'exome complet, séquençage du génome complet à basse couverture, séquençage de l'ARN complémenté d'analyses de méthylation et d'expression sur biopuces. Les mutations ponctuelles, petites insertions/délétions, les	Résultats : <u>Données démographiques :</u> - Âge moyen : 13 ans incluant 14 jeunes adultes de plus de 18 ans. - La majorité des patients avaient une maladie progressive ou une situation de récurrence, mais huit patients avaient un diagnostic primaire pour lequel aucun traitement standard n'était offert (4 gliomes de haut grade non opérables, 3 sarcomes métastatiques et un patient avec myélome multiple). - Le séquençage de l'ADN a été fait chez les 52 patients et le séquençage de l'ARN chez 48 patients. <u>Résultats des analyses moléculaires :</u> - 80 anomalies génomiques susceptibles d'être ciblées ont été révélées dans 39/52 (75 %) tumeurs.

	réel et la détermination de cibles. - Évaluer les tumeurs pédiatriques récurrentes à risque élevé en relation avec les patrons de cibles potentielles de médicaments. Contexte : 11 groupes d'études du <i>Society for Pediatric Oncology and Hematology</i> (GPOH) et le <i>German Cancer Consortium</i> (DKTK) ont réalisé le projet <i>Individualized Therapy for Relapsed Malignancies in Childhood</i> (INFORM) afin de permettre l'accès au diagnostic moléculaire de fine pointe aux patients pédiatriques en oncologie à risque élevé en Allemagne.	variations de nombre de copies et les fusions ont été relevées à partir des séquences. Les librairies pour le séquençage de l'exome complet et pour le génome complet à basse couverture ont été réalisées avec la trousse Agilent SureSelectXT Human V5. Les librairies ont été séquencées avec la trousse Illumina TruSeq RNA v2. L'identification de fusions géniques a été faite à l'aide du programme deFuse. Échantillons de tissu frais congelés avec un contenu en cellules tumorales supérieur à 40 % en histologie. Un panel d'experts a priorisé les cibles potentielles à transmettre au médecin traitant qui pouvait ensuite utiliser cette information pour la prise de décision clinique individuelle jusqu'au niveau 7, très élevé). Le score de priorisation des patients se basait sur l'existence d'un médicament associé à l'anomalie génomique détectée, la présence d'un changement génétique, l'existence d'un médicament ciblant directement l'anomalie génomique, le niveau de preuves et la spécificité.	- 26 patients (50 %) démontraient une ou plusieurs anomalies avec un potentiel pour un traitement ciblé avec un score de priorisation intermédiaire ou plus élevé (niveau 4 de 7). - 10 patients ont reçu un traitement ciblé basé sur les résultats des analyses moléculaires avec des réponses observées sur des tumeurs préalablement réfractaires au traitement. - Un seul sarcome associé à une translocation a été identifié comme ayant un gène de fusion avec un potentiel pour un traitement ciblé. Il s'agit d'un sarcome d'Ewing extrasquelettique avec la translocation <i>CIC-DUX4</i>. Toutefois, l'intérêt est uniquement biologique puisqu'aucun médicament ne cible cette translocation pour l'instant. - Un patient chez qui l'on a diagnostiqué un sarcome myofibroblastique non opérable avec fusion <i>CARS-ALK</i> a été traité par un inhibiteur d'ALK (<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>, par le biais de l'inclusion dans un essai clinique pour un inhibiteur : LDK378). Un traitement de 6 semaines a permis de réduire la taille de la tumeur de manière importante, permettant une résection complète. La rémission complète a été atteinte 9 mois après la fin du traitement. Il y a eu une récurrence avec métastases 12 mois plus tard, mais le patient a encore une fois bien répondu au traitement à l'inhibiteur d'ALK. Le traitement était toujours en cours 26 mois après l'analyse initiale. Conclusions : L'étude a démontré qu'une analyse moléculaire comprehensive d'échantillons provenant de patients pédiatriques à risque élevé en oncologie est faisable à l'échelle nationale et peut être réalisée en 4 semaines.
--	---	---	---

Harris [2016] États-Unis Étude de cohorte prospective multicentrique	Période de recherche : 5 septembre 2012 au 19 novembre 2013 et le suivi clinique a été poursuivi jusqu'en novembre 2014 Nombre de patients : 100 (89 profils moléculaires) Objectif primaire : Déterminer la faisabilité d'identifier des anomalies génomiques actionnables et offrir des recommandations de traitement personnalisé contre le cancer chez les patients pédiatriques présentant une tumeur solide à risque élevé, réfractaire ou récurrente.	Critères d'inclusion : - Âgé de 30 ans ou moins - Diagnostic de tumeur solide à risque élevé (survie globale inférieure à 25 % pour ce groupe de patients avec la même histologie, grade ou stade), ou réfractaire (progression de la tumeur sur le traitement de première intention standard) ou récurrente. - Preuve histologique de malignité au moment du diagnostic ou de la récurrence. - Suffisamment de matériel de la tumeur au moment du diagnostic ou de la récurrence ou d'une chirurgie/biopsie planifiée pour établir un profil. Exclusions : - Matériel insuffisant pour faire le profil moléculaire; - Tumeurs cérébrales. Méthodes : - Période de suivi d'un an; - Échantillons archivés ou acquis en clinique; - Détection de mutations par analyse Sequenom (OncoMap, détecte 471 mutations récurrentes dans 41 gènes liés au cancer) on SNG ciblé (OncoPanel de	Résultats : <u>Données démographiques :</u> - Période de suivi médiane : 6,8 mois (2 à 23,6 mois) - Diagnostic le plus commun : sarcome non rhabdomyosarcome - Échantillons : ▪ diagnostic seulement : 31; ▪ récurrence seulement : 40; ▪ diagnostic et récurrence : 18; ▪ chirurgies contrôles : 11 (dont 6 avaient un échantillon au moment du diagnostic ou d'une récurrence aussi). <u>Résultats du profil moléculaire :</u> - Une recommandation de traitement personnalisé a été faite dans 31 % des cas (IC95 % : 23 % - 41 %) avec un total de 39 recommandations chez ces 31 patients. Translocation dans 1 % des cas (IC95 % : 0 % – 8 %). - Les anomalies actionnables les plus communes étaient les changements du nombre de copies, suivis de mutations connues ou soupçonnées d'être délétères. - Les analyses moléculaires ont mené à une correction diagnostique chez 3 patients suite à l'identification d'une translocation. L'identification de la translocation <i>EWSR1-CREB2</i> (par séquençage de l'ARN et confirmée par SNG ciblé) a mené au changement d'un diagnostic de syndrome d'Ewing en diagnostic de sarcome myxoïde pulmonaire primaire. L'identification de la translocation <i>EWSR1-ATF1</i> (par séquençage de l'ARN et confirmée par SNG ciblé) a mené au changement d'un diagnostic de mélanome malin de stade III en diagnostic de sarcome à cellules claires cutané. L'identification de la translocation <i>EML4-NTRK3</i> (par hybridation génomique
--	---	---	--

		Agilent SureSelect sur Illumina HiSeq) et détermination du nombre de copies par hybridation génomique comparative sur puce; - La liste de fusions identifiées par séquençage de l'ARN a été révisée et les fusions à potentiel d'importance clinique ont été validées par SNG ciblé dans un laboratoire avec une certification CLIA; - Les échantillons ont été révisés par un pathologiste qui a déterminé le pourcentage de noyaux tumoraux viables et a jugé de la conformité des échantillons pour le profilage; - Les résultats des profils moléculaires ont été révisés par un panel d'experts multidisciplinaire dans le but de dégager des résultats cliniquement significatifs. Paramètres : - Le terme anomalie actionnable s'appliquait à une anomalie génomique indiquant un potentiel pour un traitement ciblé. - Le terme traitement ciblé s'appliquait à un médicament au mécanisme d'action connu, spécifique et limité pour contrer un processus oncogénique.	comparative sur puce) a mené au changement d'un diagnostic de sarcome à cellules fusiformes de grade intermédiaire en diagnostic de fibrosarcome infantile. Chez ce dernier patient, un traitement au crizotinib (inhibiteur de tyrosine kinase) a été recommandé, mais il n'a pas reçu ce traitement. - Au total, 43 patients avaient des résultats d'importance clinique potentielle. Conclusions : Une étude génomique clinique multicentrique en oncologie pédiatrique est faisable et une proportion importante de tumeurs solides réfractaires ou récurrentes possède des anomalies génomiques actionnables. Chez les enfants présentant des tumeurs solides à risque élevé, réfractaires ou récurrentes, il y a un potentiel que les résultats du profil moléculaire de la tumeur aient des implications cliniques mais il y a des obstacles à l'accès à un traitement ciblé. Limites : Petite cohorte.
--	--	--	---

		- Une recommandation de traitement personnalisé du cancer était faite en cas d'anomalie actionnable et de traitement ciblé apparié possible par essai clinique ou par médicament approuvé par la FDA, avec une dose et une formulation appropriée pour l'âge, et si le patient n'avait pas été préalablement traité avec l'agent (ou un agent similaire) du traitement ciblé proposé. Niveau de preuves concernant les recommandations : 1 et 2 : preuves provenant d'études cliniques; 3 et 4 : preuves précliniques; 5 : consensus d'experts. Si au moins 14 des 100 participants recevaient une recommandation de traitement personnalisé du cancer, l'approche était considérée comme faisable.	
Pincez [2017] France Étude de cohorte prospective unicentrique	Période de recherche : Octobre 2014 à novembre 2015 Nombre de patients : 58 patients dont 21 sarcomes But : Évaluer la faisabilité d'un comité de séquençage et de	Critères d'inclusion : - Maladie réfractaire au traitement ou récurrence; - Tumeur de mauvais pronostic au diagnostic; - Taux de survie anticipé de moins de 25 %. Population cible :	Résultats : <u>Données démographiques :</u> - Durée moyenne du suivi : 7,7 mois $\pm$ 3,4 mois. - Âge moyen : 12 ans $\pm$ 5,7 ans (0,1 à 21,5 ans). <u>Analyses moléculaires :</u> - 23 patients sur 58 (40 %) montraient une anomalie génomique actionnable (avec un total de

	biologie moléculaire de tumeurs dans un centre médical.	Patients pédiatriques présentant une tumeur réfractaire/récurrente. Méthodes : - Le comité d'analyses moléculaires des tumeurs était formé d'oncologistes, de généticiens, de biologistes et de pathologistes. - Analyses moléculaires sur tissus congelés : ▪ séquençage d'un panel de gènes ciblés (contenu de cellules tumorales minimum de 10 %); ▪ hybridation génomique comparative sur puce (contenu de cellules tumorales minimum de 30 %) - Le comité examinait le potentiel d'inclusion des patients dans des essais de traitement ciblé, selon les résultats des analyses moléculaires. Paramètres : Une anomalie actionnable a été définie comme une anomalie moléculaire dans un gène pouvant être ciblé et connu comme étant pathogénique ou prédit comme étant pathogénique. Les recommandations du comité étaient basées sur les données suivantes :	31 anomalies). Parmi ces 23 patients, 3 avaient plus d'une anomalie actionnable. - 6 patients sur 23 ont reçu un traitement ciblé (5 inclus dans une étude clinique et 1 pour une utilisation non indiquée). - 2 patients présentant un rhabdomyosarcome alvéolaire ont reçu du palbociclib en raison de l'observation d'une amplification du gène <i>CDK4</i>. - Un patient présentant un sarcome pelvien de haut grade a reçu du sirolimus, du fait de l'observation d'une mutation de mTOR. - Une translocation impliquant le gène <i>ALK</i> a été identifiée comme anomalie actionnable chez un patient présentant un ostéosarcome. Le patient s'est vu refusé pour un essai clinique sur un inhibiteur de la kinase <i>ALK</i>, du fait de désordres métaboliques découverts au moment de la sélection. - Raisons pour lesquelles les patients présentant une anomalie à potentiel d'action n'ont pas reçu de traitement ciblé : ▪ mauvais état du patient; ▪ poursuite du traitement standard; ▪ absence d'essai clinique pédiatrique; ▪ préférence de la famille. Conclusions : L'étude montre qu'un programme de séquençage pédiatrique formalisé en utilisant le matériel du diagnostic original est faisable. Le SNG par panel de gènes ciblés, combiné à l'hybridation génomique comparative sur puce, permet d'identifier des anomalies moléculaires pouvant être ciblées et permet d'émettre des recommandations pour des actions spécifiques chez certains patients.
--	--	---	--

		- Le niveau de preuves associant une pathogénicité ou la prédiction de pathogénicité à une anomalie génétique; - La situation clinique du patient; - L'accessibilité à un essai clinique pertinent.	
Watson [2018] France Étude rétrospective	Nombre de patients : 94 échantillons But : Évaluer l'efficacité du séquençage du transcriptome pour la classification de tumeurs. Définir des groupes homogènes de tumeurs avec des fusions récurrentes, selon les caractéristiques pathologiques et les analyses de profils d'expression de gènes. Proposer des gènes ou des voies de signalisation exprimés, dans des tumeurs spécifiques, comme biomarqueurs ou cibles thérapeutiques potentielles.	Critères d'inclusion : Tumeur avec diagnostic vague de sarcome non classé ou types de sarcomes pour lesquels aucune anomalie génétique pathogénique n'est connue ou sarcome présumé avec des caractéristiques génétiques et monomorphiques simples. Méthodes : - Séquençage du transcriptome sur HiSeq 2500 (librairie avec la trousse TruSeq Stranded mRNA LS). L'analyse des séquences pour la recherche de fusion a été effectuée avec le logiciel deFuse tools et Fusion-Map. - Analyse des profils d'expression par le logiciel Kallisto. - Les fusions ont été validées par RT-PCR et par séquençage de Sanger.	Résultats : - Un gène de fusion a été révélé dans 55 des 94 tumeurs analysées. Le nombre moyen de fusions détectées par échantillon était de 1,8 (en ne tenant pas compte d'un échantillon ayant plusieurs fusions sur le chromosome 1). Une seule fusion a été détectée sur 40 échantillons. De 2 à 9 fusions ont été détectées dans 14 autres échantillons. 26 des 55 échantillons positifs exprimaient un gène de fusion rapporté de manière récurrente dans la littérature ou un transcrit de fusion émergent qui n'était pas inclus dans la procédure de RT-PCR de routine utilisée. De nouvelles fusions ou variantes ont été révélées dans 29 échantillons. Onze de celles-ci, qui n'avaient pas été rapportées dans la littérature, ont été considérées comme spécifiques à la tumeur individuelle et 14 d'entre elles n'ont pu être catégorisées comme pathogéniques, du fait de lacunes concernant les connaissances sur ces gènes. Conclusions : Les sarcomes, comme les tumeurs hématologiques, démontrent une forte incidence de gènes de fusion comparativement aux carcinomes.

Oberg [2016] États-Unis Étude rétrospective unicentrique	Période de recherche : Janvier 2014 à avril 2016 Nombre de patients : 101 patients consécutifs But : Rapporter les résultats de l'intégration clinique du SNG dans la pratique d'hémo-oncologie et décrire leur influence sur la médecine du cancer basée sur l'information génomique.	Population cible : Patients pédiatriques à haut risque (représentant environ 32 % de l'ensemble des patients de cette clinique) : - Pronostic de survie globale à 5 ans de moins de 50 %; - Phénotype clinique particulier; - Forme rare de cancer sans traitement standard; - Prédisposition suspectée; - Récidive (patients ayant reçu un diagnostic avant 18 ans). Méthodes : Implantation d'une plateforme clinique de SNG pour les patients d'oncologie pédiatrique (2014). Le programme PIPseq (<i>Precision in Pediatric Sequencing</i>) utilise le SNG sur des échantillons d'ADN et d'ARN de tumeurs et du tissu normal. Les tissus étaient examinés par un pathologiste. 1) SNG d'un panel (n = 467 gènes) de gènes liés au cancer (optimisé pour FFPE); 2) SNG de l'exome complet de la tumeur et du tissu normal (optimisé pour les tissus frais	Résultats : - Le diagnostic le plus commun était un sarcome (n = 17) parmi les tumeurs solides (26 % des tumeurs solides et 17 % des tumeurs totales). - Des anomalies génétiques ont été identifiées chez 92/101 (91 %) patients. - 20 fusions ont été détectées dont 10 ont été identifiées dans des tumeurs solides. - 21 patients sur 65 (32 %) présentant une tumeur solide portaient une anomalie génétique avec un potentiel d'être ciblée. - Une fusion démontrant un potentiel de cible thérapeutique a été identifiée chez 2 des 17 patients atteints de sarcome (11,8 %). Il s'agit d'un cas de fibrosarcome congénital avec une fusion <i>EML4-NTRK3</i> pouvant être ciblée par un inhibiteur de la kinase <i>ALK</i> et d'un cas de tumeur myofibroblastique inflammatoire avec la fusion <i>VCAN-IL23R</i> pouvant être ciblée par un inhibiteur de <i>JAK</i> (ce dernier patient a d'ailleurs reçu un traitement ciblé). - L'identification de fusion a permis de fournir de l'information diagnostique dans 6 des 17 cas de sarcomes (5 confirmations et une correction) en plus de fournir de l'information sur le pronostic pour un de ces 6 cas. Conclusions : Les résultats de l'étude montrent la faisabilité d'intégrer le SNG clinique dans la pratique de l'oncologie pédiatrique. De plus, cette approche peut permettre d'éviter des traitements inefficaces ou inappropriés, de solidifier un diagnostic définitif et d'identifier des cibles génétiques ayant un potentiel clinique.
--	--	---	--

		ou congelés) (variation du nombre de copies); 3) Séquençage de l'ARN de la tumeur (optimisé pour les tissus frais ou congelés, trousse <i>TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit</i> sur séquenceur HiSeq2500) (transcrits de fusion, logiciel Tuxedo Suite incluant TopHat2, BOWTIE2 et CUFFLINKS). Les résultats des analyses moléculaires des tumeurs étaient révisés manuellement par un pathologiste avant d'être présentés à un comité multidisciplinaire. Les anomalies génétiques identifiées ont été évaluées en fonction de leur association à la maladie et du niveau de preuves de leur pertinence clinique (actionnabilité). Un rapport a ensuite été transmis à l'oncologiste référent. Les résultats non divulgués incluaient le statut de porteur, les anomalies de pertinence incertaine, les mutations liées à la forme adulte, pour lesquelles le rapport génétique est incertain ou pour lesquelles aucune intervention procurant des bénéfices cliniques n'est connue.	
--	--	---	--

Cote [2018] États-Unis Étude unicentrique rétrospective	Période de recherche : Août 2012 à octobre 2016 Nombre de patients : 133 But : - Déterminer les patients admissibles à des études cliniques en phases précoces. - Caractériser les sous-types de sarcomes ou les cancers d'origine primaire inconnue. Contexte : Sauf pour les tumeurs du stroma gastro-intestinal et du dermatofibrosarcome protuberans, il n'existe pas de traitement spécifique à des cibles moléculaires approuvés par la FDA pour les sarcomes métastatiques aux États-Unis.	Critères d'inclusion : Patients présentant des tumeurs : - Métastatiques ou locales avancées ou non résécables; - Sarcomes dont le site primaire est inconnu; - Ou tumeurs du stroma gastro-intestinal, pour lesquelles l'analyse de mutation pourrait influencer le choix ou la dose d'inhibiteur de tyrosine kinase. Population cible : Patients présentant des sarcomes des tissus mous ou osseux. Méthodes : Profilage génomique par SNG avec capture de gènes cibles (exons de 400 gènes liés au cancer et introns sélectionnés pour 31 gènes fréquemment associés à des réarrangements dans les cancers, Foundation Medicine Inc.) Les analyses couvraient les substitutions de bases, les insertions ou délétions, les changements de nombre de copies géniques et les réarrangements. Une anomalie actionnable a été définie comme une anomalie qui permettrait l'admissibilité dans une étude clinique récente ou en cours.	Résultats : - Un total de 342 anomalies génomiques ont été détectées chez 133 patients (moyenne = 1, médiane = 2, intervalle = 0 – 14). - Une moyenne de deux anomalies (0 à 14) a été décelée par échantillon de tumeur. - Au moins une mutation a été détectée dans 88 % des échantillons. - 75 mutations ont été détectées dans des gènes pouvant être ciblés avec des médicaments existants et qui permettraient une participation dans des essais cliniques. - En général, le taux de mutations estimé était bas, particulièrement pour les gènes de fusion ou les anomalies génétiques associées aux sarcomes. - Les anomalies les plus communes impliquaient des gènes du cycle cellulaire. - 29 des échantillons provenaient de sarcomes associés à des translocations. Pour deux patients, l'analyse de SNG a mené à un changement du diagnostic. Chez un patient atteint de sarcome d'Ewing (fusion <i>EWSR1-FLI1</i>), la tumeur avait initialement été diagnostiquée comme une tumeur de glande salivaire. La détection de la fusion <i>WWTR1-CAMTA</i> chez un second patient a permis de réviser le diagnostic d'angiosarcome épithélioïde de haut grade pour celui d'un hémangiothéliome épithélioïde. Conclusions : - Des mutations pouvant être testées pour un effet thérapeutique avec des médicaments existants, dans le contexte d'études cliniques, ont été détectées chez 40 % des patients. - Ces résultats indiquent qu'une approche de SNG ciblée constitue un outil utile pour diriger les patients atteints de sarcome vers des essais cliniques spécifiques à certaines mutations.
---	--	--	--

ANNEXE E

Fréquence des transcrits de fusions actionnables dans les sarcomes des tissus mous et osseux

ÉTUDE	POPULATION	TYPES DE TUMEURS	ANALYSE MOLÉCULAIRE	NOMBRE DE FUSIONS ACTIONNABLES*	NOMBRE DE PATIENTS AYANT EU ACCÈS À UN TRAITEMENT PERSONNALISÉ OU À UN ESSAI CLINIQUE†
Lucchesi <i>et al.</i> , 2018	N = 584	Sarcomes des tissus mous	SNG du génome	239/584 dont 2 sarcomes avec fusion	n. d.
Harttrampf <i>et al.</i> , 2017	N = 73 Pédiatrique	Tumeurs solides incurables, réfractaires ou récurrentes (dont 30 sarcomes)	SNG de l'ARN, du génome complet et par capture de gènes cibles HGC	2/30 sarcomes 2/9 sarcomes avec fusion	0
Pincez <i>et al.</i> , 2017	N = 58 Pédiatrique (21 ans ou moins)	Tumeurs solides réfractaires, récurrentes ou à mauvais pronostic (taux de survie anticipé < 25 %) (dont 21 sarcomes)	SNG avec capture de gènes cibles HGC	1/21 sarcomes	0
Cote <i>et al.</i> , 2018	N = 133	Tumeurs métastatiques ou locales avancées/non résécables, sarcomes de site primaire inconnu, ou TSGI pour lequel une analyse de mutation pourrait influencer le choix ou la dose d'inhibiteur de tyrosine kinase	SNG avec capture de gènes cibles	0/29 sarcomes associés à des fusions	0

ÉTUDE	POPULATION	TYPES DE TUMEURS	ANALYSE MOLÉCULAIRE	NOMBRE DE FUSIONS ACTIONNABLES*	NOMBRE DE PATIENTS AYANT EU ACCÈS À UN TRAITEMENT PERSONNALISÉ OU À UN ESSAI CLINIQUE†
Oberg <i>et al.</i> , 2016	N = 101 Pédiatrique	Tumeurs solides et hématologiques chez des patients à haut risque (pronostic de survie globale à 5 ans de moins de 50 %, phénotype clinique particulier, forme rare sans traitement standard, suspicion d'une prédisposition, récurrence) (dont 17 sarcomes)	SNG de l'exome complet Séquençage du transcriptome SNG d'un panel de gènes liés au cancer	2/17 sarcomes	1
Chang <i>et al.</i> , 2016	N = 59 Pédiatrique (25 ans ou moins)	Tumeurs solides réfractaires ou récurrentes (tumeurs du système nerveux central exclues)	SNG de l'exome complet, du transcriptome complet et analyse de polymorphismes mononucléotidiques sur biopsie	1/26 sarcomes (avec ou sans fusions)	1
Worst <i>et al.</i> , 2016	N = 52 40 ans ou moins	Tumeurs solides réfractaires, récurrentes ou avec une indication primaire spécifique (aucun traitement standard offert) (dont 25 sarcomes)	SNG de l'exome complet, du génome complet et du transcriptome	2/25 sarcomes 2/17 sarcomes avec fusion	1
Mody <i>et al.</i> , 2015	N = 91 Pédiatrique (25 ans ou moins)	Tumeurs solides et cancers hématologiques rares (ou atypiques), réfractaires ou récurrents	SNG du génome complet, du transcriptome	4/10 sarcomes	2

Abréviations : HGC : Hybridation génomique comparative; n. d. : Non disponible; SNG : Séquençage de nouvelle génération; s. o. : Sans objet; TSGI : Tumeur du stroma gastro-intestinal.

* Un comité multidisciplinaire a participé à la révision des résultats des analyses moléculaires et à l'identification d'aberrations actionnables pour les études d'Oberg, Harttrampf, Pincez, Worst et Mody et leurs collaborateurs [Harttrampf *et al.*, 2017; Pincez *et al.*, 2017; Oberg *et al.*, 2016; Worst *et al.*, 2016; Mody *et al.*, 2015].

† Basé sur l'identification d'une fusion actionnable dans un sarcome.

RÉFÉRENCES

- Al-Zaid T, Wang WL, Somaiah N, Lazar AJ. Molecular profiling of sarcomas: New vistas for precision medicine. *Virchows Arch* 2017;471(2):243-55.
- Bianchi G, Sambri A, Righi A, Dei Tos AP, Picci P, Donati D. Histology and grading are important prognostic factors in synovial sarcoma. *Eur J Surg Oncol* 2017;43(9):1733-9.
- Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res* 2012;2(1):14.
- Casali PG, Abecassis N, Bauer S, Biagini R, Bielack S, Bonvalot S, et al. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 4):iv51-iv67.
- Chang W, Brohl AS, Patidar R, Sindiri S, Shern JF, Wei JS, et al. MultiDimensional ClinOmics for precision therapy of children and adolescent young adults with relapsed and refractory cancer: A report from the Center for Cancer Research *Clin Cancer Res* 2016;22(15):3810-20.
- Cote GM, He J, Choy E. Next-generation sequencing for patients with sarcoma: A single center experience. *Oncologist* 2018;23(2):234-42.
- Dangoor A, Seddon B, Gerrand C, Grimer R, Whelan J, Judson I. UK guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Clin Sarcoma Res* 2016;6:20.
- Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, Decouvelaere AV, Péoc'h M, Istier L, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS One* 2011;6(8):e20294.
- Dufresne A, Brahmi M, Karanian M, Blay JY. Using biology to guide the treatment of sarcomas and aggressive connective-tissue tumours. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(7):443-58.
- Ellison L et Janz T. Incidence du cancer et mortalité par cancer chez les enfants au Canada. Coup d'oeil sur la santé. Ottawa, ON : Statistique Canada; 2015. Disponible à : <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/82-624-x/2015001/article/14213-fra.pdf>.
- Garcia del Muro X, de Alava E, Artigas V, Bague S, Braña A, Cubedo R, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of patients with soft tissue sarcoma by the Spanish group for research in sarcomas (GEIS). *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77(1):133-46.
- Gerrand C, Athanasou N, Brennan B, Grimer R, Judson I, Morland B, et al. UK guidelines for the management of bone sarcomas. *Clin Sarcoma Res* 2016;6:7.
- Groisberg R, Hong DS, Roszik J, Janku F, Tsimberidou AM, Javle M, et al. Clinical next-generation sequencing for precision oncology in rare cancers. *Mol Cancer Ther* 2017;17(7):1595-601.

- Harris MH, DuBois SG, Glade Bender JL, Kim A, Crompton BD, Parker E, et al. Multicenter feasibility study of tumor molecular profiling to inform therapeutic decisions in advanced pediatric solid tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) study. *JAMA Oncol* 2016;2(8):608-15.
- Harttrampf AC, Lacroix L, Deloger M, Deschamps F, Puget S, Auger N, et al. Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization (MOSCATO-01) in pediatric patients: A single institutional prospective molecular stratification trial. *Clin Cancer Res* 2017;23(20):6101-12.
- Italiano A, Di Mauro I, Rapp J, Pierron G, Auger N, Alberti L, et al. Clinical effect of molecular methods in sarcoma diagnosis (GENSARC): A prospective, multicentre, observational study. *Lancet Oncol* 2016;17(4):532-8.
- Italiano A, Mathoulin-Pelissier S, Cesne AL, Terrier P, Bonvalot S, Collin F, et al. Trends in survival for patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Cancer* 2011;117(5):1049-54.
- Kubo T, Shimose S, Fujimori J, Furuta T, Ochi M. Prognostic value of PAX3/7-FOXO1 fusion status in alveolar rhabdomyosarcoma: Systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;96(1):46-53.
- Lahat G, Lazar A, Lev D. Sarcoma epidemiology and etiology: Potential environmental and genetic factors. *Surg Clin North Am* 2008;88(3):451-81.
- Lam SW, Cleton-Jansen AM, Cleven AH, Ruano D, van Wezel T, Szuhai K, Bovée JV. Molecular analysis of gene fusions in bone and soft tissue tumors by anchored multiplex PCR-based targeted next-generation sequencing. *J Mol Diagn* 2018;20(5):653-63.
- Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, et al. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: Prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin Oncol* 2010;28(12):1982-8.
- Lucchesi C, Khalifa E, Laizet Y, Soubeyran I, Mathoulin-Pelissier S, Chomienne C, Italiano A. Targetable alterations in adult patients with soft-tissue sarcomas: Insights for personalized therapy. *JAMA Oncol* 2018;4(10):1398-404.
- Mastrangelo G, Coindre JM, Ducimetière F, Dei Tos AP, Fadda E, Blay JY, et al. Incidence of soft tissue sarcoma and beyond: A population-based prospective study in 3 European regions. *Cancer* 2012;118(21):5339-48.
- Mody RJ, Wu YM, Lonigro RJ, Cao X, Roychowdhury S, Vats P, et al. Integrative clinical sequencing in the management of refractory or relapsed cancer in youth. *JAMA* 2015;314(9):913-25.
- Neuville A, Ranchère-Vince D, Dei Tos AP, Montesco MC, Hostein I, Toffolatti L, et al. Impact of molecular analysis on the final sarcoma diagnosis: A study on 763 cases collected during a European epidemiological study. *Am J Surg Pathol* 2013;37(8):1259-68.

- Oberg JA, Glade Bender JL, Sulis ML, Pendrick D, Sireci AN, Hsiao SJ, et al. Implementation of next generation sequencing into pediatric hematology-oncology practice: Moving beyond actionable alterations. *Genome Med* 2016;8(1):133.
- Pincez T, Clément N, Lapouble E, Pierron G, Kamal M, Bieche I, et al. Feasibility and clinical integration of molecular profiling for target identification in pediatric solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64(6):e26365.
- Riley RD, Burchill SA, Abrams KR, Heney D, Sutton AJ, Jones DR, et al. A systematic review of molecular and biological markers in tumours of the Ewing's sarcoma family. *Eur J Cancer* 2003;39(1):19-30.
- Saiag P, Grob JJ, Lebbe C, Malvey J, del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of dermatofibrosarcoma protuberans. European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer* 2015;51(17):2604-8.
- Schaefer IM, Cote GM, Hornick JL. Contemporary sarcoma diagnosis, genetics, and genomics. *J Clin Oncol* 2018;36(2):101-10.
- Stegmaier S, Leuschner I, Poremba C, Ladenstein R, Kazanowska B, Ljungman G, et al. The prognostic impact of SYT-SSX fusion type and histological grade in pediatric patients with synovial sarcoma treated according to the CWS (Cooperative Weichteilsarkom Studie) trials. *Pediatr Blood Cancer* 2017;64(1):89-95.
- Urbini M, Astolfi A, Pantaleo MA, Serravalle S, Dei Tos AP, Picci P, et al. HSPA8 as a novel fusion partner of NR4A3 in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2017;56(7):582-6.
- Van de Rijn M, Guo X, Sweeney RT, Beck AH, West RB. Molecular pathological analysis of sarcomas using paraffin-embedded tissue: Current limitations and future possibilities. *Histopathology* 2014;64(1):163-70.
- Van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, et al. Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2010;28(12):1989-94.
- Von Mehren M, Randall RL, Benjamin RS, Boles S, Bui MM, Conrad EU 3rd, et al. Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14(6):758-86.
- Watson S, Perrin V, Guillemot D, Reynaud S, Coindre JM, Karanian M, et al. Transcriptomic definition of molecular subgroups of small round cell sarcomas. *J Pathol* 2018;245(1):29-40.
- Worst BC, van Tilburg CM, Balasubramanian GP, Fiesel P, Witt R, Freitag A, et al. Nextgeneration personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients – The INFORM pilot study. *Eur J Cancer* 2016;65:91-101.
- Xiao X, Garbutt CC, Hornicek F, Guo Z, Duan Z. Advances in chromosomal translocations and fusion genes in sarcomas and potential therapeutic applications. *Cancer Treat Rev* 2018;63:61-70.

ANALYSE DE ROS1 PAR IMMUNOHISTOCHEMIE (IHC) (RÉFÉRENCE - 2018.02.001)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1 Demandeur : CHU de Québec (site IUCPQ-UL)

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflit d'intérêts

Le D^r François Rousseau n'a pas participé aux délibérations et s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation, de même que l'exactitude du contenu, en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, l'expert consulté est :

- D^r Benoit Samson, hémato-oncologue, Hôpital Charles-Le Moyne

2 RÉSUMÉ

	Analyse de ROS1 par immunohistochimie (IHC)
Demandeur	Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval.
Nom et objectif de l'analyse	L'analyse de ROS1 par IHC a pour objectif de détecter les réarrangements du gène <i>ROS1</i> , en évaluant l'expression de la protéine ROS1 chez les patients ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique.
Contexte de la demande	Cette analyse est un test compagnon qui permet de cerner les patients susceptibles de répondre au crizotinib, un médicament homologué par Santé Canada. Or, le crizotinib n'a pas été évalué par l'INESSS pour cette indication et n'est pas inscrit sur les Listes. Bien que la détection des réarrangements du gène <i>ROS1</i> ne soit pas effectuée de routine au Québec, le centre demandeur affirme qu'il envoie annuellement à des laboratoires situés à l'extérieur du Québec environ dix échantillons pour recherche de réarrangements de <i>ROS1</i> . Le centre demandeur propose d'intégrer l'analyse de ROS1 par IHC dans un algorithme incluant déjà d'autres biomarqueurs du CPNPC (ALK, EGFR et PD-L1).
Données publiées	Quatorze (14) études évaluant la performance de détection des réarrangements de <i>ROS1</i> par l'anticorps D4D6 en IHC rapportent une sensibilité variant de 88 à 100 % et une spécificité variant de 57 à 100 %.
Positions d'organismes d'intérêt	Les guides de pratique du College of American Pathologists (CAP), de l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), de l'Association for Molecular Pathology (AMP), de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) et de l'European Society for Medical Oncology (ESMO) ainsi que les lignes directrices du National Comprehensive Cancer Network (NCCN), du Cancer Care Ontario (CCO) et du Lung Cancer Canada (LLC) recommandent l'analyse de ROS1 chez tous les patients ayant un CPNPC avec composante d'adénocarcinome.
Impact budgétaire	L'ajout de cette analyse au <i>Répertoire</i> pourrait générer des coûts annuels supplémentaires d'environ 710 000 \$ dans l'ensemble du Québec.
Enjeux particuliers	Parmi les enjeux associés à cette analyse, on retrouve : • L'impact de l'analyse sur le choix du traitement des patients ayant un CPNPC avec composante d'adénocarcinome sans réarrangements du gène <i>ALK</i> ni mutations du gène <i>EGFR</i>. • L'accessibilité au crizotinib (médicament associé à la présente analyse).
Recommandation	L'INESSS recommande l'introduction de l'analyse au <i>Répertoire</i> conditionnellement à l'inscription du crizotinib sur les Listes.

3 INTRODUCTION

3.1 Contexte clinique de l'évaluation

Le cancer du poumon représente le deuxième type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes et chez les hommes ainsi que la première cause de décès par cancer au Québec. En 2017, il a été estimé que 8 700 nouveaux cas de cancer du poumon auraient été diagnostiqués et que 6 700 personnes seraient décédées des suites de cette maladie. Le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) représente environ 85 % des cas de cancer du poumon et environ 25 % de ceux-ci sont de type histologique épidermoïde. La majorité des patients atteints d'un CPNPC à un stade localement avancé ou métastatique (stades 3 ou 4) ne sont pas admissibles à la chirurgie et, jusqu'à récemment, le pronostic de survie à 5 ans était de 1 à 7 %²³.

Plusieurs biomarqueurs moléculaires ont été décelés chez les patients souffrant de CPNPC avec composante d'adénocarcinome [CGARN, 2014]. La détection de certains d'entre eux permet aux patients de bénéficier de thérapies ciblées. Les biomarqueurs pour lesquels il existe une thérapie ciblée sont mentionnés dans le tableau 1.

Tableau 1 Biomarqueurs moléculaires du cancer du poumon non à petites cellules et thérapies ciblées associées

BIOMARQUEUR	ALTÉRATION	FRÉQUENCE (%)	THÉRAPIE APPROUVÉE	
			CANADA	QUÉBEC
EGFR	Mutations L858R et del19	10-15 %	géfitinib, afatinib, osimertinib, erlotinib	géfitinib, afatinib
EGFR	Mutation T790M	60 % patients dont la maladie a progressé sur anti-EGFR	osimertinib	osimertinib
ALK	Réarrangements géniques	3-5 %	crizotinib, alectinib, céritinib, brigatinib	crizotinib, céritinib, alectinib
PD-L1	Proportion des cellules cancéreuses exprimant la protéine PD-L1	≥ 50 % cellules : 28-30 % 1-49 % des cellules : 38 % < 1 % des cellules : 34 %	pembrolizumab	pembrolizumab
BRAF	Mutation V600	1-2 %	dabrafénib/ tramétinib	
ROS1	Réarrangements géniques	1-2 %	crizotinib	

Sources : Melosky *et al.*, 2018; NCCN, 2018; Reck *et al.*, 2016 et les données de l'INESSS.
Abréviations : ALK : *Anaplastic Lymphoma Kinase*; BRAF : B-Raf proto-oncogène; EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique; PD-L1 : De l'anglais *Programmed death-ligand 1*.

²³ Extrait tiré et adapté de : Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules [INESSS, 2017].

ROS1 fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase et possède une grande homologie de séquence et de fonction avec *ALK*. Des réarrangements géniques dans le gène *ROS1* créent des protéines de fusion dans lesquelles le domaine tyrosine kinase de *ROS1* devient actif de manière constitutive, ce qui favorise la prolifération cellulaire tumorale [Rikova *et al.*, 2007]. On estime que 1 à 2 % des CPNPC avec composante d'adénocarcinome présentent des réarrangements du gène *ROS1* [Gainor et Shaw, 2013].

3.2 Objectif de l'analyse proposée

L'analyse de l'expression de la protéine *ROS1* par immunohistochimie (IHC) a pour objectif de détecter la présence d'un réarrangement du gène *ROS1*. Il s'agit d'un test compagnon qui permet de déterminer, parmi les patients atteints d'un CPNPC avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique, ceux qui seraient susceptibles de répondre à Xalkori^{MC} (crizotinib), un médicament homologué par Santé Canada.

3.3 Avantages allégués par le demandeur de l'analyse proposée (promesse de valeur)

Selon le demandeur, l'introduction de l'analyse de *ROS1* par IHC permettra la détection rapide des cas positifs dans la population desservie; les patients ainsi déterminés pourraient obtenir un traitement par thérapie ciblée plutôt qu'une chimiothérapie conventionnelle.

3.4 Contexte de la demande

La détection des réarrangements du gène *ROS1* n'est pas effectuée de routine actuellement au Québec. Le centre demandeur, qui traite les patients atteints de CPNPC du centre et de l'est du Québec, propose de l'intégrer à son algorithme diagnostique (annexe A), qui inclut déjà la détection des biomarqueurs *ALK*, *EGFR* et *PD-L1*.

Le laboratoire demandeur mentionne qu'il envoie annuellement à des laboratoires situés à l'extérieur du Québec environ dix échantillons pour détection et confirmation d'un réarrangement de *ROS1*. Les frais engendrés par ces analyses sont pris en charge par les centres référents eux-mêmes, par compassion envers leurs patients²⁴.

Selon l'Avis de conformité de Santé Canada, le crizotinib peut être administré aux patients atteints d'un CPNPC localement avancé ou métastatique avec un réarrangement du gène *ALK* ou *ROS1* démontré.

²⁴ Informations obtenues lors d'une conférence téléphonique avec D^{re} Martine Périgny, anatomopathologiste au CHU de Québec-Hôtel-Dieu de Québec, et les D^{rs} Christian Couture et Patrice Desmeules, anatomopathologistes à l'IUCPQ – Université Laval, le 11 septembre 2018.

Au Québec, en octobre 2015, l'INESSS a recommandé au ministre de la Santé et des Services sociaux d'ajouter une indication reconnue à Xalkori^{MC} sur les listes de médicaments pour le traitement de première intention chez les personnes atteintes d'un CPNPC localement avancé ou métastatique et qui présentent la mutation du gène *ALK* [INESSS, 2015]. Concernant l'indication de Xalkori^{MC} pour les patients présentant un réarrangement du gène *ROS1*, le fabricant (Pfizer) n'a pas encore présenté de demande à l'INESSS. Or, le médicament n'est pas inscrit sur les listes pour le traitement des patients ayant un CPNPC présentant un réarrangement du gène *ROS1*.

4 PRÉCISIONS CONCERNANT L'ANALYSE

4.1 Description de la méthode

La détection consiste en une IHC permettant d'évaluer qualitativement l'intensité du marquage généré par l'anticorps dirigé contre *ROS1*. Typiquement, une IHC positive montre de fines granules cytoplasmiques [Bubendorf *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2014].

Les résultats positifs en IHC doivent ensuite être confirmés par une analyse moléculaire ou cytogénétique [Bubendorf *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2013].

4.2 Modalité d'administration du test selon le demandeur

Le prélèvement de la biopsie et l'inclusion en paraffine seront effectués par les laboratoires des centres référents. Par la suite, le bloc de paraffine sera acheminé au laboratoire d'anatomopathologie et de cytologie de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval.

Le bloc y sera découpé en lames non colorées pour les analyses d'*ALK*, *PD-L1* et *ROS1*, puis une extraction d'ADN sera effectuée pour l'analyse d'*EGFR*. Dès que l'interprétation de l'analyse d'*ALK* et d'*EGFR* sera terminée, l'analyse de *ROS1* par IHC sera réalisée uniquement sur les spécimens qui présentent une absence de réarrangement du gène *ALK* et de mutation du gène *EGFR*.

Advenant le cas où la quantité de tissu prélevée chez le patient ne permettrait pas d'établir sans équivoque la présence d'une composante d'adénocarcinome ou d'exclure un cancer épidermoïde, l'analyse de *ROS1* par IHC sera effectuée.

Les résultats seront interprétés par une équipe de cinq anatomopathologistes spécialisés en pathologie pulmonaire, puis seront colligés à l'intérieur d'un rapport incluant les résultats des analyses pour *ALK*, *EGFR*, *ROS1* et *PD-L1*, qui sera acheminé au clinicien requérant.

Le délai de réponse prévu pour les analyses de *ROS1* (détection et confirmation) est de 5 jours ouvrables.

4.3 Société ou concepteur

Il s'agit d'une analyse maison. Le centre demandeur utilise l'anticorps *ROS1* (clone D4D6^{MC}) de la compagnie Cell Signaling Technology^{MC}, le seul anticorps commercialisé, et la trousse de détection EnVision FLEX de la compagnie Agilent Technologies (Dako).

4.4 Homologation

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont pas été homologuées par Santé Canada ni par la Food and Drug Administration (FDA).

4.5 Valeur pondérée : 167,01

Le protocole du consortium canadien utilise l'anticorps ROS1 à une dilution 1:20, ce qui contribue aux coûts élevés de l'analyse. Le demandeur prévoit faire diminuer les coûts inhérents à l'analyse par IHC en optimisant sa méthode. Par ailleurs, la venue sur le marché d'un deuxième anticorps ROS1 provenant d'une autre compagnie est attendue pour l'automne²⁵.

4.6 Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le centre demandeur estime recevoir un peu moins de la moitié de toutes les demandes d'analyses de cancer pulmonaire du Québec. En 2017, il a réalisé 2 145 analyses pour les biomarqueurs du cancer du poumon. De ces analyses, 1 659 consistaient en une recherche de réarrangement d'*ALK* par IHC. Considérant un taux de positivité de 2 % pour *ALK* et de 10 % pour *EGFR*, et vu que le demandeur propose d'effectuer uniquement l'IHC de ROS1 sur les échantillons exempts de réarrangement du gène *ALK* et de mutation du gène *EGFR*, il prévoit devoir procéder à 1 460 analyses de ROS1.

4.7 Données médico administratives

Cette analyse ne figure pas au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*, ci-après nommé *Répertoire*.

4.8 Assurance qualité

Le laboratoire du demandeur ne participe à aucun programme de contrôle de qualité externe pour l'analyse de ROS1.

Toutefois, une étude pancanadienne (CROS pour Canadian ROS1), regroupant 14 centres à travers le pays et à laquelle le laboratoire du demandeur participe, est en cours de validation d'une IHC visant à analyser ROS1 dans des spécimens issus de CPNPC.

²⁵ Informations obtenues lors d'une conférence téléphonique avec D^{re} Martine Périgny, anatomopathologiste au CHU de Québec-Hôtel-Dieu de Québec, et les D^{rs} Christian Couture et Patrice Desmeules, anatomopathologistes à l'IUCPQ – Université Laval, le 11 septembre 2018.

5 Données publiées

5.1 Validité analytique

Quatorze (14) études comparant la performance de détection de ROS1 par l'anticorps D4D6 en IHC avec le FISH ou la PCR comme comparateur ont été retenues (tableau 2).

TABEAU 2 Performance de l'anticorps ROS1 D4D6 en IHC sur des biopsies d'adénocarcinomes

ÉTUDE N ÉCHANTILLONS	CRITÈRE DE POSITIVITÉ SCORE-H (%) OU INTENSITÉ (1+, 2+, 3+)	SENSIBILITÉ (%)	SPÉCIFICITÉ (%)	COMPARATEUR
Sholl <i>et al.</i> , 2013 n = 218	≥ 2 + ≥ 3 +	100 87,5	92 98	FISH
Cha <i>et al.</i> , 2014 Cohorte rétrospective n = 219	≥ 100 % ≥ 75 % ≥ 2 +, 3 +	100 100 100	99,1 98,6 98,1	FISH
Cha <i>et al.</i> , 2014 Cohorte prospective n = 111	≥ 100 % ≥ 75 % ≥ 2 +, 3 +	100 100 100	95,3 93,4 88,7	FISH
Mescam-Mancini <i>et al.</i> , 2014 n = 121	≥ 2 +	100	96,9	FISH
Yoshida <i>et al.</i> , 2014 n = 270	≥ 150 % ≥ 100 % ≥ 75 %	94 94 94	98 92 90	FISH et PCR
Boyle <i>et al.</i> , 2015 n = 33	≥ 100 %	100	100	FISH et PCR
Rogers <i>et al.</i> , 2015 n = 322	≥ 1 +	33,3	99,7	FISH
Shan <i>et al.</i> , 2015 n = 60	≥ 1 +	100	93,6	FISH et PCR
Cao <i>et al.</i> , 2016 n = 183	≥ 1 +	100	96,7	FISH
Clave <i>et al.</i> , 2016 n = 282	≥ 3 +	100	87,5	FISH
Kao <i>et al.</i> , 2016 n = 205	≥ 1 +	100	100	FISH
Viola <i>et al.</i> , 2016 n = 39	≥ 100 %	100	83	FISH
Selinger <i>et al.</i> , 2017 n = 104	≥ 1 + ≥ 3 +	100 100	76 100	FISH
Su <i>et al.</i> , 2017 n = 57*	≥ 1 +	100	86	FISH et SNG
Zhao <i>et al.</i> , 2018 n = 1 638	≥ 150 %	100	57,4	FISH

Abréviations : FISH : Hybridation in situ en fluorescence; PCR : Réaction de polymérisation en chaîne.

*Les échantillons contiennent des biopsies d'adénocarcinomes et d'autres types de cancer.

Les résultats provenant de ces études rapportent une sensibilité variant de 88 % à 100 % (si on exclut la sensibilité de 33 % obtenue par Rogers et ses collaborateurs) et une spécificité variant de 57 % à 100 %.

La performance de l'anticorps est liée aux critères utilisés pour déterminer la positivité du marquage ROS1. En effet, la variabilité de la sensibilité et de la spécificité entre les études peut être en partie expliquée par la méthode utilisée comme critère de positivité. Certains auteurs utilisent le score-H²⁶, qui consiste en une méthode d'évaluation du marquage des IHC [Yoshida *et al.*, 2014], alors que d'autres préfèrent l'intensité du marquage en tant que tel (0, 1 +, 2 +, 3 +).

6 POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Guide de pratique clinique appuyé par une revue systématique

- Guide de pratique clinique publié conjointement par le College of American Pathologists (CAP), l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) et l'Association for Molecular Pathology (AMP) [Lindeman *et al.*, 2018]

Ce guide recommande l'analyse de ROS1 chez tous les patients présentant un adénocarcinome pulmonaire de stade avancé, sans égard à leurs caractéristiques cliniques puisque les réarrangements de *ROS1* sont mutuellement exclusifs des altérations des autres gènes, notamment *EGFR*, *KRAS* et *ALK* (recommandation forte). Ce guide recommande également que la détection soit réalisée par IHC et qu'un résultat positif soit confirmé par une méthode moléculaire ou cytogénétique (consensus d'experts).

- American Society of Clinical Oncology (ASCO) [Kalemkerian *et al.*, 2018]

Le panel d'expert de l'ASCO a déterminé que les recommandations du CAP/IASLC/AMP en lien avec la détection des biomarqueurs en cancer du poumon étaient claires, étayées et appuyées par les meilleures preuves scientifiques disponibles. L'ASCO approuve les recommandations du CAP concernant les réarrangements de *ROS1* sans autres modifications (consensus d'experts).

- European Society for Medical Oncology (ESMO) [Planchard *et al.*, 2018]

L'ESMO mentionne que l'analyse du réarrangement du gène *ROS1* devrait être systématiquement réalisée dans les CPNPC avancés [III,A]²⁷. Bien que la détection de la translocation de *ROS1* par FISH demeure le standard, l'IHC pourrait être utilisée pour détecter un réarrangement [IV,A]²⁸.

²⁶ Le score-H se définit par l'intensité du marquage (caractérisé par 0, 1 +, 2 +, 3 +) multipliée par l'étendue du marquage (le nombre de cellules considérées comme positives en pourcentage). La valeur du Score-H varie de 0 à 300.

²⁷ ESMO, III, A : selon des études de cohortes prospectives, niveau de preuve élevé avec un bénéfice clinique considérable, fortement recommandé.

²⁸ ESMO, IV, A : selon des études de cohortes ou des études de cas-témoins, niveau de preuve élevé avec un bénéfice clinique considérable, fortement recommandé.

Lignes directrices d'associations professionnelles

- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [2018]

Les analyses d'IHC peuvent être utilisées comme approche de détection seulement en raison d'une spécificité faible pour les cas positifs. Les cas positifs en IHC devaient être confirmés avant d'envisager l'utilisation d'un inhibiteur de tyrosine kinase (recommandation non gradée).

- Cancer Care Ontario (CCO) [Ellis *et al.*, 2016]

Le CCO recommande que les patients ayant un CPNPC de stade avancé (stades 4 et 3B non admissibles à un traitement curatif) dont l'analyse pour les réarrangements de *ROS1* est positive soient traités en première intention par thérapie ciblée (recommandation non gradée). Ils mentionnent qu'aucune aide financière n'existe en Ontario pour couvrir les coûts engendrés par l'analyse de *ROS1*.

- Lung Cancer Canada (LCC) [Melosky *et al.*, 2018]

Le guide de pratique rédigé par un groupe d'experts formé par la LCC recommande l'analyse de *ROS1* chez les patients présentant un CPNPC de stade avancé, dès le diagnostic (recommandation non gradée). Aucune méthode n'est préconisée.

7 DONNÉES FOURNIES PAR LE DEMANDEUR

Le demandeur a fourni des données de validation. Le tableau 3 montre les résultats des analyses *ROS1* par IHC et par FISH concomitantes sur 17 échantillons d'adénocarcinomes pulmonaires fournis par un laboratoire central et sur 12 échantillons sélectionnés dans la banque de tumeurs de l'IUCPQ.

Tableau 3 Résultats des analyses ROS1 par IHC et par FISH concomitantes sur des échantillons d'adénocarcinomes pulmonaires

#Cas	Analyse IHC		Analyse FISH					Résultats attendus, laboratoire externe
			# cellules positives (compte sur 50 cellules rapporté sur 100)				positif (seuil ≥15%)	
	H-score	+/-	Lecteur 1	Lecteur 2	Relecture	moyenne (%)	+/-	
ValExt1	275	+	43	54	.	49	+	+
ValExt2	190	+	87	83	.	85	+	+
ValExt3	0	-	4	1	.	3	-	-
ValExt4	280	+	77	87	.	82	+	+
ValExt5	0	-	7	0	.	4	-	-
ValExt6	0	-	3	1	.	2	-	-
ValExt7	0	-	3	3	.	3	-	-
ValExt8	0	-	5	1	.	3	-	-
ValExt9	200	+	91	81	.	86	+	+
ValExt10	0	-	5	4	.	5	-	-
ValExt11	0	-	14	5	.	10	-	-
ValExt12	0	-	2	1	.	2	-	-
ValExt13	285	+	87	73	.	80	+	+
ValExt14	180	+	54	66	.	60	+	+
ValExt15	155	+	91	96	.	94	+	+
ValExt16	270	+	45	69	.	57	+	+
ValExt17	200	+	78	83	.	81	+	+
Intensité max		+/-						
IUCPQ1	2+	+	40	22	.	31	+	.
IUCPQ2	2+	+	58	44	.	51	+	.
IUCPQ3	2+	+	30	25	.	28	+	.
IUCPQ4	2+	+	66	32	.	49	+	.
IUCPQ5	3+	+	18	16	.	17	+	.
IUCPQ6	3+	+	84	78	.	80	+	.
IUCPQ7	3+	+	46	32	.	39	+	.
IUCPQ8	3+	+	28	44	.	34	+	.
IUCPQ9	3+	+	12	16	16	15	+	.
IUCPQ10	3+	+	18	22	.	20	+	.
IUCPQ11	3+	+	22	16	.	19	+	.
IUCPQ12	3+	+	96	92	.	94	+	.

Note : La technique d'immunohistochimie a été effectuée sur plateforme Dako avec l'anticorps primaire ROS1 D4D6 de Cell Signalling Technologies avec dilution 1 :20. Le H-score est obtenu en additionnant les multiples de pourcentage de tumeur par l'intensité de marquage pour chaque degré d'intensité (0,1,2,3), pour un score maximal de 300.

Source : Tiré des documents fournis par le demandeur.

8 IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* du test permettant la détection des réarrangements de *ROS1* par IHC chez les patients atteints d'un CPNPC avec une composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique (stade 3 ou 4). Cette analyse a pour objectif de détecter les tumeurs présentant un réarrangement du gène *ROS1* en vue de l'utilisation d'une thérapie ciblée. La confirmation des cas positifs doit être effectuée par FISH. Les coûts liés à ce test de confirmation sont présentés dans un autre avis de l'INESSS. Les coûts liés à l'analyse de *ROS1* par IHC sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective d'un laboratoire responsable de la réalisation de l'analyse. L'analyse porte sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans les tableaux 3 et 4. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- Compte tenu du fait que les coûts de réalisation de l'analyse de *ROS1* par IHC sont jugés importants par le demandeur, les tests seraient d'abord effectués chez les patients sans réarrangement du gène *ALK* ni mutation du gène *EGFR*. Lorsque les procédures techniques seront optimisées (p. ex. dilution d'anticorps) et qu'un second anticorps sera offert, les coûts pourraient être de moindre ampleur et permettre l'analyse de *ROS1* simultanément à l'analyse d'*ALK*, *EGFR* et *PD-L1*.
- À l'initiative du demandeur, l'analyse proposée a fait l'objet d'envois hors Québec au cours de l'année dernière. Aucune donnée ne figure dans les registres du MSSS. Le coût unitaire de ces envois est évalué à 1 152,59 \$ par le demandeur. Advenant que l'analyse de confirmation par FISH ne soit pas réalisée lors de ces envois, un remboursement est effectué. Le rapatriement de ces envois hors Québec est prévu dès la première année suivant l'ajout de l'analyse au *Répertoire*.
- Du 1er janvier au 31 décembre 2017, le laboratoire du CHU de Québec, site IUCPQ, a réalisé 1 659 analyses d'*ALK* par IHC. En s'appuyant sur ces données et en considérant une fréquence de positivité de 2 % pour le gène *ALK* et de 10 % pour le gène *EGFR*, le demandeur anticipe que l'analyse de *ROS1* par IHC serait réalisée sur 1 460 échantillons en testant uniquement les cas sans réarrangement du gène *ALK* ni mutation du gène *EGFR*.
- Une augmentation du nombre d'échantillons reçus pour analyse a récemment été constatée par le demandeur. Ainsi, 1 549 analyses de *ROS1* par IHC sont anticipées pour l'année 2018-2019.
- Le demandeur considère que ces analyses représenteraient près de la moitié de celles requises pour répondre à la demande de l'ensemble des établissements québécois. Ainsi, près de 4 000 analyses pourraient être requises annuellement au Québec.
- Ainsi, il est anticipé que 1 549, 1 642 et 1 740 analyses seraient réalisées au cours des trois prochaines années, respectivement, à l'IUCPQ. Au Québec, il est estimé que 4 000, 4 250 et 4 500 analyses seraient réalisées dans la même période.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur pour l'analyse de *ROS1* par IHC est de 167,01.

Tableau 3 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* de l'analyse permettant de détecter les réarrangements de *ROS1* par IHC dans les CPNPC avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique – IUCPQ

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Analyses de ROS1 par IHC	1 549	1 642	1 740	4 931
Impact net	258 714 \$	274 247 \$	290 615 \$	823 576 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			411 788 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			1 209 058 \$

Tableau 4 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* de l'analyse permettant de détecter les réarrangements de *ROS1* par IHC dans les CPNPC avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique – Québec

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Analyses de ROS1 par IHC	4 000	4 250	4 500	12 750
Impact net	668 080 \$	709 835 \$	751 590 \$	2 129 505 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			1 064 753 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			2 658 624 \$

Ainsi, l'ajout de l'analyse de ROS1 dans les CPNPC avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique pourrait générer des coûts supplémentaires d'environ 275 000 \$ par année pour les besoins actuels de l'IUCPQ. Ces coûts sont estimés à 710 000 \$ pour l'ensemble du Québec.

9 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Plusieurs enjeux associés à l'analyse proposée ont été soulevés et considérés lors de la formulation de la recommandation :

- L'impact potentiel de l'analyse sur le choix du traitement des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules avec composante d'adénocarcinome négatif pour les gènes *EGFR* et *ALK*. En effet, l'analyse pourrait permettre de déterminer les patients admissibles à une thérapie ciblée, plutôt que de les diriger vers une chimiothérapie conventionnelle.
- Le traitement par crizotinib en première intention des patients présentant des réarrangements du gène *ALK* ou *ROS1* est approuvé par Santé Canada. Toutefois, le fabricant du médicament associé au test n'a pas encore fait de demande d'évaluation à l'INESSS concernant l'indication du Xalkori^{MC} pour les patients présentant des réarrangements du gène *ROS1*. Ainsi, l'inscription d'un test compagnon dans le *Répertoire* alors que le médicament associé n'a pas été évalué par l'INESSS constitue un enjeu.

10 RECOMMANDATION DE L'INESSS

Analyses de ROS1 par immunohistochimie (IHC)

La recommandation de l'INESSS

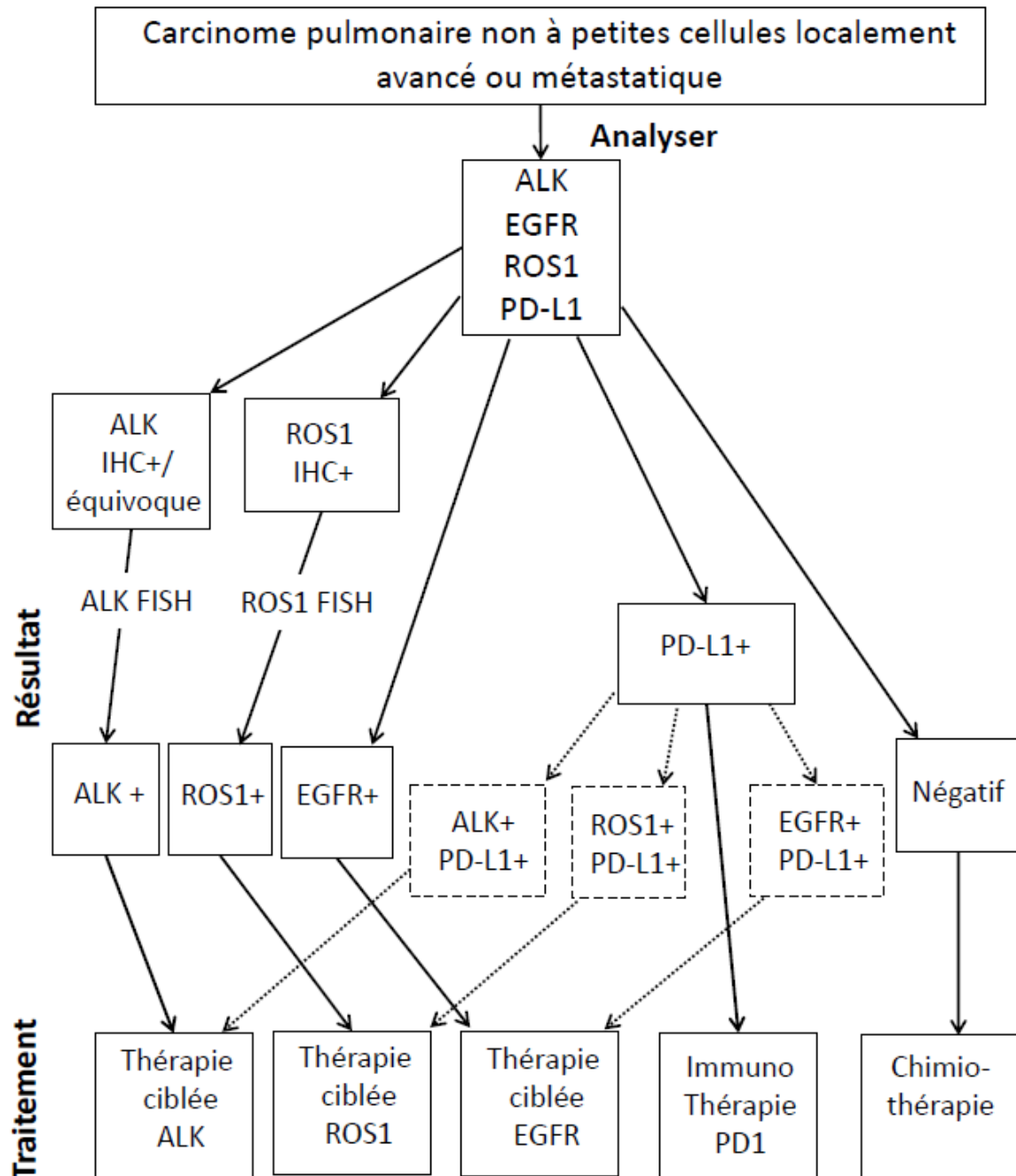
- ☐ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire* conditionnelle à l'inscription du crizotinib sur les Listes.
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'analyse ROS1 est un test compagnon dont le médicament associé n'a pas été évalué par l'INESSS pour l'indication visée.
- ✓ L'INESSS reconnaît l'importance que le test compagnon soit offert sans délai advenant une inscription sur les Listes du médicament associé.
- ✓ Les données de validation analytique ont été jugées suffisantes.

ANNEXE A :

Algorithme clinique de diagnostic et de traitement



RÉFÉRENCES

- Boyle TA, Masago K, Ellison KE, Yatabe Y, Hirsch FR. ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2015;16(2):106-11.
- Bubendorf L, Buttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: A review with recommendations. *Virchows Arch* 2016;469(5):489-503.
- Cancer Genome Atlas Research Network (CGARN). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543-50.
- Cao B, Wei P, Liu Z, Bi R, Lu Y, Zhang L, et al. Detection of lung adenocarcinoma with ROS1 rearrangement by IHC, FISH, and RT-PCR and analysis of its clinicopathologic features. *Onco Targets Ther* 2016;9:131-8.
- Cha YJ, Lee JS, Kim HR, Lim SM, Cho BC, Lee CY, Shim HS. Screening of ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry and comparison with ALK rearrangements. *PLoS ONE* 2014;9(7):e103333.
- Clave S, Gimeno J, Munoz-Marmol AM, Vidal J, Reguart N, Carcereny E, et al. ROS1 copy number alterations are frequent in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;7(7):8019-28.
- Ellis PM, Vella ET, Ung YC, Lung Cancer Disease Site Group. Systemic treatment for patients with advanced non-small cell lung. Guideline 7-10 Version 3. Cancer Care Ontario (CCO). Toronto, ON : 2016. Disponible à : <https://www.cancercareontario.ca/en/guidelines-advice/types-of-cancer/31811>.
- Gainor JF et Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013;18(7):865-75.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules. Québec, Qc : INESSS; 2017. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Juin_2017/04-Expression-proteine-PD-L1-immunohistochimie.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments – Médicament d'exception – Avec conditions. Québec, Qc : INESSS; 2015. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Fevrier_2016/Xalkori_2015_10_cav.pdf.
- Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2018;36(9):911-9.

- Kao HL, Yeh YC, Lin CH, Hsu WF, Hsieh WY, Ho HL, Chou TY. Diagnostic algorithm for detection of targetable driver mutations in lung adenocarcinomas: Comprehensive analyses of 205 cases with immunohistochemistry, real-time PCR and fluorescence in situ hybridization methods. *Lung Cancer* 2016;101:40-7.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(3):321-46.
- Melosky B, Blais N, Cheema P, Couture C, Juergens R, Kamel-Reid S, et al. Standardizing biomarker testing for Canadian patients with advanced lung cancer. *Curr Oncol* 2018;25(1):73-82.
- Mescam-Mancini L, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, Rouquette I, Souquet PJ, Audigier-Valette C, et al. On the relevance of a testing algorithm for the detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2014;83(2):168-73.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Non-small cell lung cancer. Version 3.2018. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Fort Washington, PA : NCCN; 2018. Disponible à : https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
- Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823-33.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131(6):1190-203.
- Rogers TM, Russell PA, Wright G, Wainer Z, Pang JM, Henricksen LA, et al. Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10(4):611-8.
- Selinger CI, Li BT, Pavlakis N, Links M, Gill AJ, Lee A, et al. Screening for ROS1 gene rearrangements in non-small-cell lung cancers using immunohistochemistry with FISH confirmation is an effective method to identify this rare target. *Histopathology* 2017;70(3):402-11.
- Shan L, Lian F, Guo L, Qiu T, Ling Y, Ying J, Lin D. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: Comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR. *PLoS ONE* 2015;10(3):e0120422.

- Sholl LM, Sun H, Butaney M, Zhang C, Lee C, Janne PA, Rodig SJ. ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2013;37(9):1441-9.
- Su Y, Goncalves T, Dias-Santagata D, Hoang MP. Immunohistochemical detection of ROS1 fusion. *Am J Clin Pathol* 2017;147(1):77-82.
- Viola P, Maurya M, Croud J, Gazdova J, Suleman N, Lim E, et al. A validation study for the use of ROS1 immunohistochemical staining in screening for ROS1 translocations in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11(7):1029-39.
- Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, Shibata T, et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol* 2014;27(5):711-20.
- Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, et al. ROS1-rearranged lung cancer: A clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol* 2013;37(4):554-62.
- Zhao J, Chen X, Zheng J, Kong M, Wang B, Ding W. A genomic and clinicopathological study of non-small-cell lung cancers with discordant ROS1 gene status by fluorescence in-situ hybridisation and immunohistochemical analysis. *Histopathology* 2018;73(1):19-28.

ANALYSE DE ROS1 PAR HYBRIDATION *IN SITU* EN FLUORESCENCE (FISH) (RÉFÉRENCE – 2018.03.002)

Avis d'évaluation

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : CHU de Québec (site IUCPQ-UL)

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflit d'intérêts

Le D^r François Rousseau n'a pas participé aux délibérations et s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation, de même que l'exactitude du contenu, en fonction de leur domaine d'expertise respectif.

Aux fins de validation du présent avis, l'expert consulté est :

- D^r Benoit Samson, hémato-oncologue, Hôpital Charles-Le Moyne

2. RÉSUMÉ

	Analyse de ROS1 par hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (FISH)
Demandeur	Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval.
Nom et objectif de l'analyse	L'analyse de ROS1 par FISH a pour objectif de confirmer la présence d'un réarrangement du gène <i>ROS1</i> chez les patients ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique, dont l'analyse de ROS1 par immunohistochimie (IHC) s'est avérée positive.
Contexte de la demande	Cette analyse est un test compagnon qui permet de déterminer les patients susceptibles de répondre au crizotinib, un médicament homologué par Santé Canada. Or, au moment d'écrire cet avis, le crizotinib n'a pas été évalué par l'INESSS pour cette indication et n'est pas inscrit sur les Listes. Bien que la détection des réarrangements du gène <i>ROS1</i> ne soit pas effectuée de routine au Québec, le centre demandeur affirme qu'il envoie annuellement à des laboratoires situés à l'extérieur du Québec environ dix échantillons, pour recherche de réarrangements de <i>ROS1</i>. Le centre demandeur propose d'intégrer l'analyse de ROS1 par FISH dans un algorithme incluant déjà d'autres biomarqueurs du CPNPC (ALK, EGFR et PD-L1).
Données publiées	La seule étude retenue montre que la sensibilité et la spécificité du FISH permettant de confirmer la présence de réarrangements du gène <i>ROS1</i> sont de 100 %.
Positions d'organismes d'intérêt	Les guides de pratique du College of American Pathologists (CAP), de l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), de l'Association for Molecular Pathology (AMP), de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) et de l'European Society for Medical Oncology (ESMO) ainsi que les lignes directrices du National Comprehensive Cancer Network (NCCN), du Cancer Care Ontario (CCO) et du Lung Cancer Canada (LLC) recommandent l'analyse de ROS1 chez tous les patients ayant un CPNPC avec composante d'adénocarcinome.
Impact budgétaire	L'ajout de cette analyse au <i>Répertoire</i> pourrait générer des coûts annuels supplémentaires d'environ 67 000 \$ pour l'ensemble du Québec.
Enjeux particuliers	Parmi les enjeux associés à cette analyse, on retrouve : • L'impact de l'analyse sur le choix du traitement des patients ayant un CPNPC avec composante d'adénocarcinome sans réarrangements du gène <i>ALK</i> ni mutations du gène <i>EGFR</i>. • L'accessibilité au crizotinib (médicament associé à la présente analyse).
Recommandation	L'INESSS recommande l'introduction de l'analyse au <i>Répertoire</i> conditionnellement à l'inscription du crizotinib sur les Listes.

3. INTRODUCTION

3.1. Contexte clinique de l'évaluation

Le cancer du poumon représente le deuxième type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes et chez les hommes ainsi que la première cause de décès par cancer au Québec. En 2017, il a été estimé que 8 700 nouveaux cas de cancer du poumon auraient été diagnostiqués et que 6 700 personnes seraient décédées des suites de cette maladie. Le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) représente environ 85 % des cas de cancer du poumon et environ 25 % de ceux-ci sont de type histologique épidermoïde. La majorité des patients atteints d'un CPNPC à un stade localement avancé ou métastatique (stades 3 ou 4) ne sont pas admissibles à la chirurgie et, jusqu'à récemment, le pronostic de survie à 5 ans était de 1 % à 7 %²⁹.

Plusieurs biomarqueurs moléculaires ont été décelés chez les patients souffrant de CPNPC avec composante d'adénocarcinome [CGARN, 2014]. La détection de certains d'entre eux permet aux patients de bénéficier de thérapies ciblées. Les biomarqueurs pour lesquels il existe une thérapie ciblée sont mentionnés dans le tableau 1.

Tableau 1 Biomarqueurs moléculaires du cancer du poumon non à petites cellules et thérapies ciblées associées

BIOMARQUEUR	ALTÉRATION	FRÉQUENCE (%)	THÉRAPIE APPROUVÉE	
			CANADA	QUÉBEC
EGFR	Mutations L858R et del19	10-15 %	géfitinib, afatinib, osimertinib, erlotinib	géfitinib, afatinib
EGFR	Mutation T790M	60 % patients dont la maladie a progressé sur anti-EGFR	osimertinib	osimertinib
ALK	Réarrangements géniques	3-5 %	crizotinib, alectinib, céritinib, brigatinib	crizotinib, céritinib, alectinib
PD-L1	Proportion des cellules cancéreuses exprimant la protéine PD-L1	≥ 50 % cellules : 28-30 % 1-49 % des cellules : 38 % < 1 % des cellules : 34 %	pembrolizumab	pembrolizumab
BRAF	Mutation V600	1-2 %	dabrafénib/ tramétinib	
ROS1	Réarrangements géniques	1-2 %	crizotinib	

Sources : Melosky *et al.*, 2018; NCCN, 2018; Reck *et al.*, 2016 et les données de l'INESSS.

Abréviations : ALK : *Anaplastic Lymphoma Kinase*; BRAF : B-Raf proto-oncogène; EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique; PD-L1 : De l'anglais *Programmed death-ligand 1*.

²⁹ Extrait tiré et adapté de : Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules [INESSS, 2017].

ROS1 fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase et possède une grande homologie de séquence et de fonction avec *ALK*. Des réarrangements géniques dans le gène *ROS1* créent des protéines de fusion dans lesquelles le domaine tyrosine kinase de *ROS1* devient actif de manière constitutive, ce qui favorise la prolifération cellulaire tumorale [Rikova *et al.*, 2007]. On estime que 1 à 2 % des CPNPC avec composante d'adénocarcinome présentent des réarrangements du gène *ROS1* [Gainor et Shaw, 2013].

3.2. Objectif de l'analyse proposée

L'analyse de l'expression de la protéine *ROS1* par hybridation in situ en fluorescence (FISH) a pour objectif de confirmer la présence d'un réarrangement du gène *ROS1* initialement détecté en immunohistochimie (IHC). Il s'agit d'un test compagnon qui permet de déterminer, parmi les patients atteints d'un CPNPC avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique, ceux qui seraient susceptibles de répondre à Xalkori^{MC} (crizotinib), un médicament homologué par Santé Canada.

3.3. Avantages allégués par le demandeur de l'analyse proposée (promesse de valeur)

Selon le demandeur, l'introduction de l'analyse de confirmation des réarrangements de *ROS1* par FISH permettra la détection rapide des cas positifs dans la population desservie; les patients ainsi déterminés pourraient obtenir un traitement par thérapie ciblée plutôt qu'une chimiothérapie conventionnelle.

Le demandeur propose de confirmer par FISH uniquement les cas sans réarrangement du gène *ALK* et sans la mutation activatrice du gène *EGFR*, dont l'analyse de *ROS1* par IHC s'est avérée positive afin de réduire le nombre de tests.

3.4. Contexte de la demande

La détection des réarrangements du gène *ROS1* n'est pas effectuée de routine actuellement au Québec. Le centre demandeur, qui traite les patients atteints de CPNPC du centre et de l'est du Québec propose de l'intégrer à son algorithme diagnostique (annexe A), qui inclut déjà la détection des biomarqueurs *ALK*, *EGFR* et PD-L1.

Le laboratoire demandeur mentionne qu'il envoie annuellement à des laboratoires situés à l'extérieur du Québec environ dix échantillons, pour détection et confirmation d'un réarrangement de *ROS1*. Les frais engendrés par ces analyses sont pris en charge par les centres référents eux-mêmes, par compassion envers leurs patients³⁰.

Selon l'Avis de conformité de Santé Canada, le crizotinib peut être administré aux patients atteints d'un CPNPC localement avancé ou métastatique avec un réarrangement du gène *ALK* ou *ROS1* démontré.

Au Québec, en octobre 2015, l'INESSS a recommandé au ministre de la Santé et des Services sociaux d'ajouter une indication reconnue à Xalkori^{MC} sur les listes de

³⁰ Informations obtenues lors d'une conférence téléphonique avec D^{re} Martine Périgny, anatomopathologiste au CHU de Québec-Hôtel-Dieu de Québec, et les D^{rs} Christian Couture et Patrice Desmeules, anatomopathologistes à l'IUCPQ – Université Laval, le 11 septembre 2018.

médicaments pour le traitement de première intention chez les personnes atteintes d'un CPNPC localement avancé ou métastatique et qui présentent la mutation du gène *ALK* [INESSS, 2015]. Concernant l'indication de Xalkori^{MC} pour les patients présentant un réarrangement du gène *ROS1*, le fabricant (Pfizer) n'a pas encore présenté de demande d'évaluation à l'INESSS. Or, le médicament n'est pas inscrit sur les listes pour le traitement des patients ayant un CPNPC présentant un réarrangement du gène *ROS1*.

4. PRÉCISIONS CONCERNANT L'ANALYSE

4.1. Description de la méthode

Les cas positifs en IHC pour un réarrangement de *ROS1* doivent être confirmés par une analyse moléculaire ou cytogénétique. Dans ce cas-ci, le demandeur propose d'utiliser une hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) qui permet d'évaluer qualitativement le pourcentage des cellules tumorales positives au marquage pour *ROS1* par la stratégie de point de bris (*break-apart*). Il existe deux types de patrons de signaux : le patron typique *break-apart*, où un signal de fusion et deux signaux correspondant aux extrémités 3' et 5' sont observés, et un patron atypique, où on observe un signal émanant de l'extrémité 3', accompagné d'un signal de fusion et d'un signal de l'extrémité 3' sans le signal de fusion (figure 1). Les échantillons sont considérés comme positifs lorsqu'un réarrangement est observé dans plus de 15 % des cellules tumorales analysées [Bubendorf *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2013].

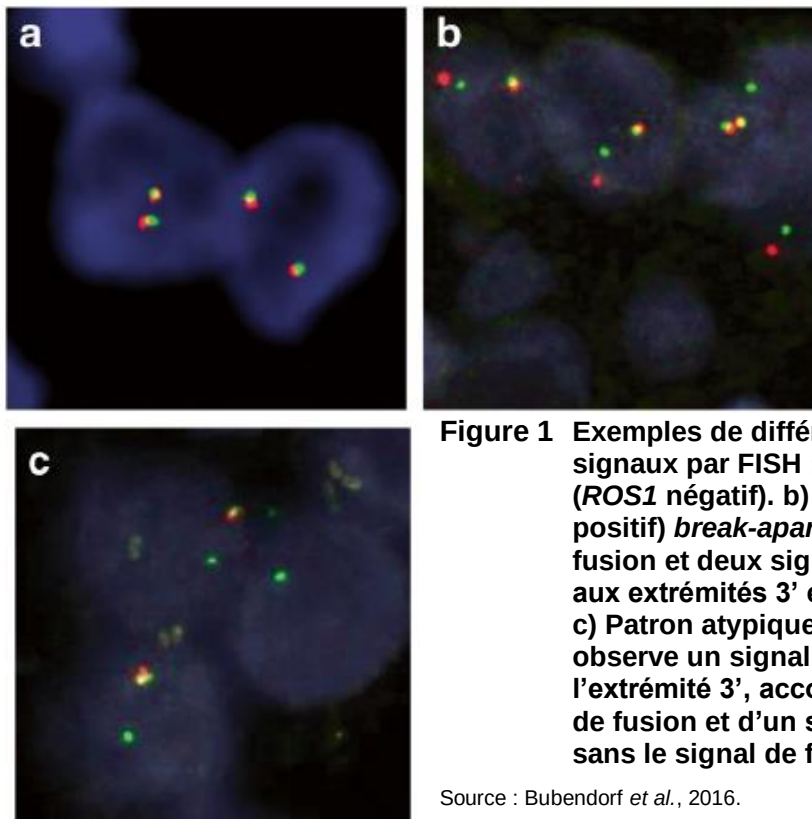


Figure 1 Exemples de différents patrons de signaux par FISH : a) Patron normal (*ROS1* négatif). b) Patron typique (*ROS1* positif) *break-apart*, où un signal de fusion et deux signaux correspondant aux extrémités 3' et 5' sont observés. c) Patron atypique (*ROS1* positif), où on observe un signal émanant de l'extrémité 3', accompagné d'un signal de fusion et d'un signal de l'extrémité 3' sans le signal de fusion.

Source : Bubendorf *et al.*, 2016.

4.2. Modalité d'administration du test selon le demandeur

Le prélèvement de la biopsie et l'inclusion en paraffine seront effectués par les laboratoires des centres référents. Par la suite, le bloc de paraffine sera acheminé au laboratoire d'anatomopathologie et de cytologie de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) – Université Laval.

Le bloc y sera découpé en lames non colorées pour les analyses d'ALK, PD-L1 et ROS1, puis une extraction d'ADN sera effectuée pour l'analyse d'EGFR. Dès que l'interprétation de l'analyse d'ALK et d'EGFR sera terminée, l'analyse de ROS1 par IHC sera réalisée uniquement sur les spécimens qui présentent une absence de réarrangement du gène *ALK* et de mutation du gène *EGFR*.

Les cas positifs ou équivoques suite à l'analyse par IHC seront testés par FISH pour confirmer la présence d'un réarrangement du gène *ROS1*. Les résultats seront interprétés par une équipe de cinq anatomopathologistes spécialisés en pathologie pulmonaire, puis seront colligés à l'intérieur d'un rapport incluant les résultats des analyses pour ALK, EGFR, ROS1 et PD-L1, qui sera acheminé au clinicien requérant.

Le délai de réponse prévu pour les analyses de ROS1 (détection et confirmation) est de 5 jours ouvrables.

4.3. Société ou concepteur

Il s'agit d'une analyse maison. Le centre demandeur utilise une sonde point de bris pour *ROS1* (*SureFISH ALK, ROS1 and RET*) de la compagnie Agilent Technologies et des réactifs maison.

4.4. Homologation

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont pas été homologuées par Santé Canada ni par la Food and Drug Administration (FDA).

4.5. Valeur pondérée : 156,98

4.6. Nombre d'analyses prévues et de patients visés

Le centre demandeur estime recevoir un peu moins de la moitié de toutes les demandes d'analyses de cancer pulmonaire du Québec. En 2017, il a réalisé 2 145 analyses pour les biomarqueurs du cancer du poumon. De ces analyses, 1 659 consistaient en une recherche de réarrangement d'*ALK* par IHC. Considérant un taux de positivité de 2 % pour ALK et de 10 % pour EGFR, et vu que le demandeur propose d'effectuer uniquement l'IHC de ROS1 sur les échantillons exempts de réarrangement du gène *ALK* et de mutation du gène *EGFR*, il prévoit devoir procéder à 1 460 analyses de ROS1 par IHC.

Selon le demandeur, il a été estimé qu'environ 10 % des échantillons seront positifs suite à l'analyse par IHC et devront être confirmés par FISH, ce qui représente environ 150 analyses. De plus, il est attendu qu'environ 2 % des spécimens analysés par IHC soient positifs suite à la confirmation par FISH.

4.7. Données médico administratives

Cette analyse ne figure pas au Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale.

4.8. Assurance qualité

Le laboratoire du demandeur ne participe à aucun programme de contrôle de qualité externe pour l'analyse de *ROS1*.

5. DONNÉES PUBLIÉES

5.1. Validité analytique

Une étude comparant la performance de détection des réarrangements du gène *ROS1* par FISH avec la PCR comme comparateur a été retenue (tableau 2).

Tableau 2 Performance de la détection des réarrangements du gène *ROS1* par FISH sur des biopsies d'adénocarcinomes

ÉTUDE N ÉCHANTILLONS	CRITÈRE DE POSITIVITÉ NOMBRE DE CELLULES TUMORALES POSITIVES (%)	SENSIBILITÉ (%)	SPÉCIFICITÉ (%)	COMPARATEUR
Yoshida <i>et al.</i> , 2013 patients <i>ROS1</i> + n = 15 patients <i>ROS1</i> - n = 50	15 %	100	100	PCR

Abréviations : FISH : Hybridation in situ en fluorescence; PCR : Réaction de polymérisation en chaîne.

Lorsque le seuil de positivité des cellules tumorales positives est de 15 %, la sensibilité et la spécificité du FISH permettant de confirmer les échantillons avec et sans réarrangement du gène *ROS1* sont de 100 %.

6. POSITIONS OU ORIENTATIONS D'ORGANISATIONS D'INTÉRÊT CONCERNANT L'ANALYSE ÉVALUÉE

Guides de pratique clinique appuyés par une revue systématique

- Guide de pratique clinique publié conjointement par le College of American Pathologists (CAP), l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) et l'Association for Molecular Pathology (AMP) [Lindeman *et al.*, 2018]

Ce guide recommande l'analyse de *ROS1* chez tous les patients présentant un adénocarcinome pulmonaire de stade avancé, sans égard à leurs caractéristiques cliniques puisque les réarrangements de *ROS1* sont mutuellement exclusifs des altérations des autres gènes, notamment *EGFR*, *KRAS* et *ALK* (recommandation forte). Ce guide recommande également que la détection soit réalisée par IHC et qu'un résultat positif soit confirmé par une méthode moléculaire ou cytogénétique (consensus d'experts).

- American Society of Clinical Oncology (ASCO) [Kalemkerian *et al.*, 2018]

Le panel d'expert de l'ASCO a déterminé que les recommandations du CAP/IASLC/AMP en lien avec la détection des biomarqueurs en cancer du poumon étaient claires, étayées et appuyées par les meilleures preuves scientifiques disponibles. L'ASCO approuve les recommandations du CAP concernant les réarrangements de *ROS1* sans autres modifications (consensus d'experts).

- European Society for Medical Oncology (ESMO) [Planchard *et al.*, 2018]

L'ESMO mentionne que l'analyse du réarrangement du gène *ROS1* devrait être systématiquement réalisée dans les cas de CPNPC avancé [III,A]³¹. Bien que la détection de la translocation de *ROS1* par FISH demeure le standard, l'IHC pourrait être utilisée pour détecter un réarrangement [IV,A]³².

Lignes directrices d'associations professionnelles

- National Comprehensive Cancer Network (NCCN) [2018]

Les analyses d'IHC peuvent être utilisées comme approche de détection seulement en raison d'une spécificité faible pour les cas positifs. Les cas positifs en IHC devaient être confirmés avant d'envisager l'utilisation d'un inhibiteur de tyrosine kinase (recommandation non gradée).

- Cancer Care Ontario (CCO) [Ellis *et al.*, 2016]

Le CCO recommande que les patients ayant un CPNPC de stade avancé (stades 4 et 3B non admissibles à un traitement curatif), dont l'analyse pour les réarrangements de *ROS1* est positive, soient traités en première intention par thérapie ciblée (recommandation non gradée). Ils mentionnent qu'aucune aide financière n'existe en Ontario pour couvrir les coûts engendrés par l'analyse de *ROS1*.

- Lung Cancer Canada (LCC) [Melosky *et al.*, 2018]

Le guide de pratique rédigé par un groupe d'experts formé par la LCC recommande l'analyse de *ROS1* chez les patients présentant un CPNPC de stade avancé, dès le diagnostic (recommandation non gradée). Aucune méthode n'est préconisée.

³¹ ESMO, III, A : selon des études de cohortes prospectives, niveau de preuve élevé avec un bénéfice clinique considérable, fortement recommandé.

³² ESMO, IV, A : selon des études de cohortes ou des études de cas-témoins, niveau de preuve élevé avec un bénéfice clinique considérable, fortement recommandé.

7. DONNÉES FOURNIES PAR LE DEMANDEUR

Les éléments de validation concernant la technique de confirmation d'un réarrangement de *ROS1* par FISH utilisée pour détecter les réarrangements de *ROS1* dans les CPNPC sont présentés ci-après (ces informations sont tirées des documents fournis par le demandeur).

La sonde *ROS1* d'Agilent (SureFISH *ROS1* BA; centromérique-rouge et télomérique-vert) a été retenue et est utilisée avec un tampon maison. Les différentes étapes pour assurer la fiabilité de la sonde sont les suivantes :

1- Sensibilité et spécificité

La sonde proposée a initialement été testée sur 9 échantillons connus positifs et 8 échantillons connus négatifs fournis par un laboratoire central (voir tableau 3). Compte tenu d'un seuil de positivité de 15 % (patron typique : deux signaux séparés 3' et 5' et un signal de fusion, ou patron atypique : un signal 3' isolé et un signal de fusion), et d'un compte total de 100 cellules (50 cellules pour chacun des deux lecteurs différents), les 9 cas positifs ont montré une fraction de cellules réarrangées supérieure à 15 % (100 %) et les 8 cas négatifs ont eu des comptes inférieurs à 15 % (100 %). La sonde a ensuite été testée sur 11 cas additionnels montrant une expression immunohistochimique forte de *ROS1* et tous les cas présentaient un taux de cellules avec réarrangements supérieur ou égal à 15 %.

2- Reproductibilité et robustesse

Un cas connu positif pour un réarrangement *ROS1* par FISH a été testé dans une même série, en triplicata, et lors de trois séries différentes effectuées à trois moments distincts, et ce, par deux opérateurs différents. Dans chaque cas, les résultats du décompte effectué ont montré des résultats concordants.

Tableau 3 Résultats des analyses ROS1 par IHC et par FISH concomitantes sur des échantillons d'adénocarcinomes pulmonaires

#Cas	Analyse IHC		Analyse FISH					Résultats attendus, laboratoire externe
			# cellules positives (compte sur 50 cellules rapporté sur 100)				positif (seuil ≥15%)	
	H-score	+/-	Lecteur 1	Lecteur 2	Relecture	moyenne (%)	+/-	
ValExt1	275	+	43	54	.	49	+	+
ValExt2	190	+	87	83	.	85	+	+
ValExt3	0	-	4	1	.	3	-	-
ValExt4	280	+	77	87	.	82	+	+
ValExt5	0	-	7	0	.	4	-	-
ValExt6	0	-	3	1	.	2	-	-
ValExt7	0	-	3	3	.	3	-	-
ValExt8	0	-	5	1	.	3	-	-
ValExt9	200	+	91	81	.	86	+	+
ValExt10	0	-	5	4	.	5	-	-
ValExt11	0	-	14	5	.	10	-	-
ValExt12	0	-	2	1	.	2	-	-
ValExt13	285	+	87	73	.	80	+	+
ValExt14	180	+	54	66	.	60	+	+
ValExt15	155	+	91	96	.	94	+	+
ValExt16	270	+	45	69	.	57	+	+
ValExt17	200	+	78	83	.	81	+	+
Intensité max								
		+/-						
IUCPQ1	2+	+	40	22	.	31	+	.
IUCPQ2	2+	+	58	44	.	51	+	.
IUCPQ3	2+	+	30	25	.	28	+	.
IUCPQ4	2+	+	66	32	.	49	+	.
IUCPQ5	3+	+	18	16	.	17	+	.
IUCPQ6	3+	+	84	78	.	80	+	.
IUCPQ7	3+	+	46	32	.	39	+	.
IUCPQ8	3+	+	28	44	.	34	+	.
IUCPQ9	3+	+	12	16	16	15	+	.
IUCPQ10	3+	+	18	22	.	20	+	.
IUCPQ11	3+	+	22	16	.	19	+	.
IUCPQ12	3+	+	96	92	.	94	+	.

Note : La technique d'immunohistochimie a été effectuée sur plateforme Dako avec l'anticorps primaire ROS1 D4D6 de Cell Signalling Technologies avec dilution 1 :20. Le H-score est obtenu en additionnant les multiples de pourcentage de tumeur par l'intensité de marquage pour chaque degré d'intensité (0,1,2,3), pour un score maximal de 300.

Source : Tiré des documents fournis par le demandeur.

8. IMPACT BUDGÉTAIRE

L'analyse d'impact budgétaire considère les coûts liés à l'ajout au *Répertoire* du test permettant la confirmation des réarrangements de *ROS1* détectés par FISH chez les patients atteints d'un CPNPC avec une composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique (stade 3 ou 4). Cette analyse permettrait de confirmer quels patients pourraient recevoir une thérapie ciblée à la suite d'une analyse par IHC. Seuls les coûts liés à ce test de confirmation sont présentés dans cette analyse. Les coûts liés à l'analyse de *ROS1* par IHC sont présentés dans un autre avis publié par l'INESSS. Les coûts liés à l'analyse de *ROS1* par FISH sont projetés sur un horizon temporel de trois ans selon la perspective d'un laboratoire responsable de la réalisation de l'analyse. L'analyse porte sur des données épidémiologiques ainsi que sur des hypothèses appuyées par des études cliniques et l'opinion d'experts. L'évaluation des coûts est présentée dans les tableaux 4 et 5. Les principales hypothèses émises aux fins de l'analyse sont les suivantes :

- Selon le demandeur, le nombre d'analyses par FISH destinées à une confirmation est estimé à 10 %. Selon le nombre d'analyses de *ROS1* par IHC, 150 analyses de *ROS1* par FISH seraient réalisées par année.
- Compte tenu du fait qu'une augmentation du nombre d'échantillons reçus pour la détection des réarrangements du gène *ROS1* a récemment été constatée par le demandeur, 155 analyses de *ROS1* par FISH sont anticipées pour l'année 2018-2019.
- Le demandeur considère que ces analyses représenteraient près de la moitié de celles requises pour répondre à la demande de l'ensemble des établissements québécois. Ainsi, près de 400 analyses pourraient être requises annuellement au Québec.
- Ainsi, il est anticipé que 155, 164 et 174 analyses seraient réalisées au cours des trois prochaines années, respectivement, à l'IUCPQ. Au Québec, il est estimé que 400, 425 et 450 analyses seraient réalisées dans la même période.
- La valeur pondérée proposée par le demandeur pour l'analyse de *ROS1* par FISH est de 156,98.

Tableau 4 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* de l'analyse permettant de confirmer les réarrangements de *ROS1* détectés par FISH dans les CPNPC avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique – IUCPQ

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Analyses de <i>ROS1</i> par FISH	155	164	174	493
Impact net	24 332 \$	25 745 \$	27 315 \$	77 391 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			71 426 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			85 083 \$

Tableau 5 Coûts liés à l'introduction au *Répertoire* de l'analyse permettant de confirmer les réarrangements de *ROS1* détectés par FISH dans les CPNPC avec composante d'adénocarcinome localement avancé ou métastatique – Québec

	AN 1	AN 2	AN 3	TOTAL
Analyses de ROS1 par FISH	400	425	450	1 275
Impact net	62 792 \$	66 717 \$	70 641 \$	200 150 \$
Analyses de sensibilité	Pour 3 ans, coûts les plus faibles			180 213 \$
	Pour 3 ans, coûts les plus élevés			220 243 \$

9. ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Plusieurs enjeux associés à l'analyse proposée ont été soulevés et considérés lors de la formulation de la recommandation :

- L'impact potentiel de l'analyse sur le choix du traitement des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules avec composante d'adénocarcinome négatif pour les gènes *EGFR* et *ALK*. En effet, l'analyse pourrait permettre de déterminer les patients admissibles à une thérapie ciblée, plutôt que de les diriger vers une chimiothérapie conventionnelle.
- Le traitement par crizotinib en première intention des patients présentant des réarrangements du gène *ALK* ou *ROS1* est approuvé par Santé Canada. Toutefois, le fabricant du médicament associé au test n'a pas encore fait de demande d'évaluation à l'INESSS concernant l'indication du Xalkori^{MC} pour les patients présentant des réarrangements du gène *ROS1*. Ainsi, l'inscription d'un test compagnon dans le *Répertoire* alors que le médicament associé n'a pas été évalué par l'INESSS constitue un enjeu.

10. RECOMMANDATION DE L'INESSS

Analyse de ROS1 par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

La recommandation de l'INESSS

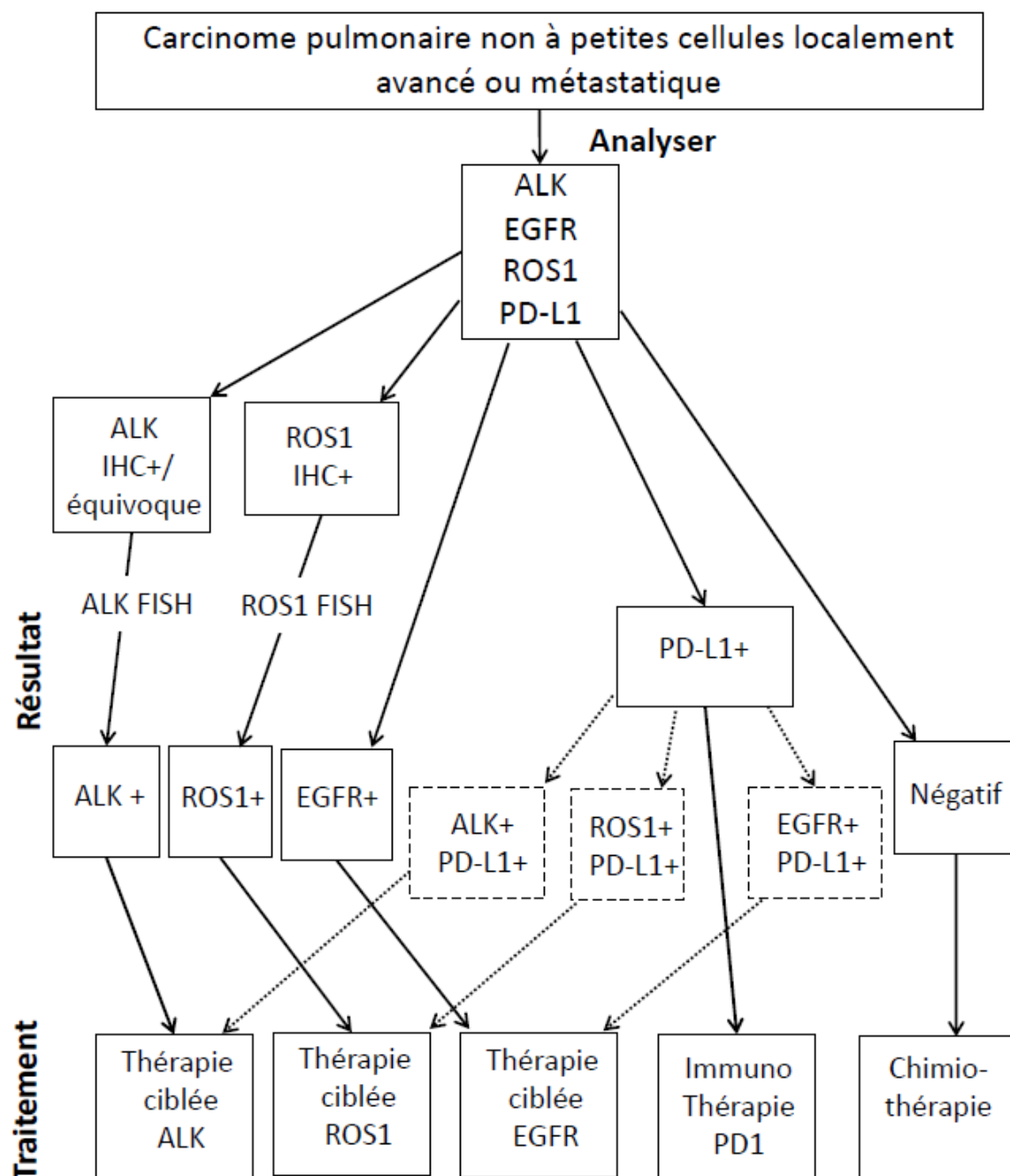
- ☐ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire* conditionnelle à l'inscription du crizotinib sur les Listes.
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ L'analyse ROS1 est un test compagnon dont le médicament associé n'a pas été évalué par l'INESSS pour l'indication visée.
- ✓ L'INESSS reconnaît l'importance que le test compagnon soit offert sans délai advenant une inscription sur les Listes du médicament associé.
- ✓ Les données de validation analytique ont été jugées suffisantes.

ANNEXE

Algorithme clinique de diagnostic et de traitement



RÉFÉRENCES

- Bubendorf L, Buttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: A review with recommendations. *Virchows Arch* 2016;469(5):489-503.
- Cancer Genome Atlas Research Network (CGARN). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543-50.
- Ellis PM, Vella ET, Ung YC, Lung Cancer Disease Site Group. Systemic treatment for patients with advanced non-small cell lung. Guideline 7-10 Version 3. Cancer Care Ontario (CCO). Toronto, ON : 2016. Disponible à : <https://www.cancercareontario.ca/en/guidelines-advice/types-of-cancer/31811>.
- Gainor JF et Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *Oncologist* 2013;18(7):865-75.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Expression de la protéine PD-L1 par immunohistochimie dans le cancer du poumon non à petites cellules. Québec, Qc : INESSS; 2017. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Juin_2017/04-Expression-proteine-PD-L1-immunohistochimie.pdf.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Xalkori^{MC} – Cancer du poumon non à petites cellules. Avis d'ajout d'une indication reconnue aux listes de médicaments – Médicament d'exception – Avec conditions. Québec, Qc : INESSS; 2015. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Inscription_medicaments/Avis_au_ministre/Fevrier_2016/Xalkori_2015_10_cav.pdf.
- Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2018;36(9):911-9.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142(3):321-46.
- Melosky B, Blais N, Cheema P, Couture C, Juergens R, Kamel-Reid S, et al. Standardizing biomarker testing for Canadian patients with advanced lung cancer. *Curr Oncol* 2018;25(1):73-82.

- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Non-small cell lung cancer. Version 3.2018. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Fort Washington, PA : NCCN; 2018. Disponible à : https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
- Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1–positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823-33.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131(6):1190-203.
- Yoshida A, Kohno T, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Shimada Y, et al. ROS1-rearranged lung cancer: A clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol* 2013;37(4):554-62.

*Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux*

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563

inesss.qc.ca

