



HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ

ÉVALUER

LES TECHNOLOGIES DE SANTÉ

**RAPPORT
D'ÉVALUATION**

Définition des conditions de réalisation des tests de détection des mutations activatrices de l'EGFR et des mutations BRAF, NRAS, et KRAS

Validé par le Collège le 9 septembre 2021

Descriptif de la publication

Titre	Définition des conditions de réalisation des tests de détection des mutations activatrices de l'EGFR et des mutations BRAF, NRAS, et KRAS
Méthode de travail	Évaluation d'une technologie de santé
Objectif(s)	Définir la population cible et les conditions de réalisation des tests de détection des mutations activatrices de l'EGFR et des mutations BRAF, NRAS, et KRAS
Cibles concernées	Oncologues, anatomo-cytopathologistes et biologistes médicaux formés en biologie moléculaire, patients concernés par les indications du test compagnon
Demandeur	Union Nationale des Caisses d'assurance maladie (UNCAM)
Promoteur(s)	Haute Autorité de santé (HAS), service évaluation des actes professionnels (SEAP)
Pilotage du projet	Coordination : Sébastien Bine et Nassima Yahiaoui, chefs de projet SEAP (chef de service : Cédric Carbonneil, adjointe au chef de service : Nadia Squalli) Secrétariat : Lina Biscosi, assistante, SEAP
Recherche documentaire	Stratégie de recherche documentaire décrite en Annexe 1. Réalisée par Emmanuelle Blondet documentaliste, et Sylvie Lascols, assistante documentaliste, sous la responsabilité de Frédérique Pagès, cheffe du service documentation - veille, et Christine Devaud, adjointe à la cheffe de service
Auteurs	Sébastien Bine et Nassima Yahiaoui, chefs de projet SEAP, sous la responsabilité de Nadia Squalli, adjointe au chef de service SEAP
Validation	Version du 9 septembre 2021
Actualisation	
Autres formats	Pas d'autre format que le format électronique disponible sur www.has-sante.fr

Ce document ainsi que sa référence bibliographique sont téléchargeables sur www.has-sante.fr 

Haute Autorité de santé – Service communication information
5 avenue du Stade de France – 93218 Saint-Denis la Plaine Cedex. Tél. : +33 (0)1 55 93 70 00
© Haute Autorité de santé – septembre 2021 – ISBN :

Sommaire

Résumé	5
Introduction	8
1. Présentation du thème	9
1.1. La recherche de mutations en génétique somatique	9
1.1.1. Voie de signalisation du facteur de croissance épidermique (EGF) et thérapies ciblées	9
1.1.2. La détection des mutations en génétique somatique	12
1.2. Évaluation de la HAS	14
1.3. Prise en charge actuelle	15
2. Méthode d'évaluation	16
2.1. Objectifs de l'évaluation	16
2.2. Champ d'évaluation	16
2.3. Recherche et sélection bibliographique	17
2.3.1. Recherche bibliographique	17
2.3.2. Sélection bibliographique	17
2.4. Sollicitation des parties prenantes	17
2.4.1. Liste des organismes sollicités	17
2.4.2. Méthode de consultation	18
2.5. Point de vue des patients	18
3. Résultats de l'évaluation	19
3.1. Population cible des tests compagnons	19
3.1.1. Test de détection des mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK	19
3.1.2. Test de détection de la mutation V600 du gène BRAF	20
3.1.3. Tests de détection des mutations des gènes KRAS et NRAS	20
3.2. Conditions préalables de mise en œuvre des tests	22
3.3. Conditions de réalisation d'un test compagnon	23
3.3.1. Phase pré-analytique	23
3.3.1.1. Prélèvement de l'échantillon	23
3.3.1.2. Préparation, qualification et sélection de l'échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomo-cyto-pathologie	24
3.3.2. Phase analytique : la recherche des mutations	24
3.3.2.1. Extraction des acides nucléiques du tissu fixé	24
3.3.2.2. Techniques d'analyse moléculaire	25
3.3.3. Phase post-analytique	26
3.3.3.1. Interprétation des résultats	26

3.3.3.2.	Communication des résultats	27
3.3.3.3.	Délai de rendu des résultats	27
3.3.3.4.	Éléments devant figurer dans le compte-rendu de génétique moléculaire (CR-GM)	27
3.3.4.	Récapitulatif des acteurs et de leur rôle aux différentes étapes de réalisation du test compagnon	28
3.3.5.	Contrôle qualité	29
3.3.6.	Synthèse des conditions de réalisations des tests de recherche de mutations des gènes de l'EGFR -TK, BRAF, KRAS et NRAS	31
3.4.	Synthèse de la position des professionnels	34
3.4.1.	Concernant la population cible des tests	34
3.4.2.	Concernant les conditions préalables de mise en œuvre des tests	34
3.4.3.	Concernant les conditions de réalisation d'un test compagnon	34
3.4.3.1.	Phase pré-analytique	35
3.4.3.2.	Phase analytique	35
3.4.3.3.	Phase post-analytique	36
3.4.3.4.	Assurance Qualité	37
	Conclusion	38
	Table des figures et des tableaux	40
	Table des annexes	41
	Références bibliographiques	42
	Participants	45
	Abréviations et acronymes	46

Résumé

Objectif

Les tests de détection des mutations activatrices du gène EGFR codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur de l'*Epidermal Growth Factor* (EGFR-TK) et des mutations des gènes BRAF, NRAS, et KRAS sont des tests dits « compagnons » ou « théragnostiques », car ils sont associés à une thérapie ciblée dont la mise en œuvre dépend de leurs résultats prédictifs de l'efficacité ou de la résistance au traitement selon les cas. En 2014 et en 2015, ces tests ont reçu un avis favorable de la HAS pour leurs remboursements. Ce rapport fait suite à une demande complémentaire de l'UNCAM, qui souhaite une description de la population cible et des conditions de réalisation de ces quatre tests, en vue de permettre leur hiérarchisation et la mise en œuvre de la procédure de leur inscription sur la Liste des actes et prestations. Actuellement, la prise en charge de ces quatre tests a lieu *via* une inscription sur la Liste complémentaire (LC) d'actes de biologie médicale et d'anatomie et cytologie pathologiques (ACP).

Méthode

La méthode d'évaluation de ce rapport a été définie dans le document de cadrage¹ validé par le Collège de la HAS et publié en juillet 2020. Elle consiste dans un premier temps en une recherche systématique de la littérature synthétique et des recommandations de bonne pratique, sélectionnée sur les critères explicites, et de tous documents disponibles publiés depuis 2012 évaluant et/ou décrivant les aspects organisationnels liés à la réalisation des quatre tests compagnons conformément aux indications définies dans les AMMs des thérapies ciblées qui leur sont associées. Dans un second temps, le Conseil national professionnel des pathologistes (CNPath) et le Groupe francophone de cyto-génomique oncologique (GFCO) ont été consultés comme parties prenantes afin de recueillir leur point de vue à titre collectif sur la base de l'annexe du dossier pharmaceutique actuellement en vigueur dans le cadre de l'évaluation des tests compagnons.

Conclusion

En réponse à la demande de l'UNCAM, les données recueillies et analysées dans le cadre de ce travail sont les suivantes :

- ➔ les populations cibles des tests correspondent aux patients concernés par les indications définies dans les AMMs des thérapies ciblées associées à leurs tests compagnons ; elles sont estimées à partir des données d'activité de génétique somatique de l'INCa (2018)² :
 - recherche de mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK dans le cancer bronchique non à petites cellules localement avancé ou métastaté : 22 400 patients³ ;
 - recherche de mutations du gène BRAF V600 dans le mélanome non résecable ou métastatique : 6 200 patients ;
 - recherche de mutations du gène KRAS dans le cancer colorectal métastatique : 18 700 patients ;

¹ https://www.has-sante.fr/jcms/p_3194755/fr/definition-des-conditions-de-realisation-des-tests-de-detection-des-mutations-activatrices-du-domaine-tyrosine-kinase-du-recepteur-egfr-et-des-mutations-braf-nras-kras-note-de-cadrage

² Une analyse des données plus récente n'était pas disponible lors de la rédaction de rapport, compte tenu de la crise COVID-19.

³ Cette valeur correspondant à l'activité pour l'année 2018 fait suite à une baisse de 20% de l'activité par rapport à 2017.

- recherche de mutations du gène NRAS dans le cancer colorectal métastatique : 16 400 patients.
- ➔ la prescription du test peut être réalisée par le médecin clinicien en charge du patient, par le médecin anatomo-cyto-pathologiste (ACP) responsable du diagnostic ou encore par un médecin de la réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) ;
- ➔ la phase pré-analytique⁴ du test est réalisée par un médecin ACP. Elle comprend des étapes de prélèvement, de préparation, de qualification et de sélection de l'échantillon :
 - la préparation de l'échantillon s'effectue soit par la méthode de fixation en formol suivie d'une inclusion en paraffine (FFPE) (acte N005), soit par la cryoconservation (acte N006) ; une préparation adéquate de l'échantillon permettra de garantir l'intégrité de l'ADN à analyser ;
 - la qualification de l'échantillon correspondant à un contrôle macroscopique et microscopique de l'échantillon. Elle permet notamment d'identifier la présence d'éventuels facteurs confondants (e.g. tissu nécrose, cellule stromale) et surtout de déterminer la cellularité tumorale de l'échantillon dont la teneur doit être de l'ordre de 20 à 25 %, toujours supérieure à la limite de détection de la technique d'analyse utilisée ;
- ➔ la phase analytique du test comprend une étape d'extraction de l'ADN de l'échantillon fixé et la recherche de mutations par technique moléculaire ; elle est réalisée par un biologiste médical ou un médecin ACP, formés en biologie moléculaire :
 - l'extraction des acides nucléiques du tissu fixé (FFPE ou cryoconservé) comprend un processus de lyse cellulaire, d'élimination des protéines puis de purification / concentration de l'ADN à analyser ;
 - les techniques de biologie moléculaire utilisées pour la réalisation de ces tests reposent essentiellement sur la PCR ciblée (la technique *High Resolution Melting*, la Snapshot, et la technique Taqman®) et sur le séquençage des acides nucléiques (méthode de Sanger, pyroséquençage) ; il n'existe pas de technique de référence ;
- ➔ la phase post-analytique comprend l'interprétation, la validation et la communication des résultats aux médecins prescripteurs *via* l'envoi du compte-rendu de l'examen de génétique moléculaire (CR-GM). Elle est réalisée par les professionnels ayant effectué la phase analytique. Une fois la communication des résultats faite, le médecin clinicien communique au patient les résultats du test génétique et le choix thérapeutique qui en découle ;
- ➔ conformément à la réglementation en vigueur, les laboratoires de biologie moléculaire doivent être accrédités par le Comité français d'accréditation (COFRAC) selon les critères de la norme ISO 15189 (norme de qualité internationale de référence pour les laboratoires de biologie médicale). Chaque technique d'analyse utilisée par le laboratoire doit faire l'objet d'un dossier de validation de la méthode reposant essentiellement sur :
 - l'évaluation des performances de la technique notamment *via* l'estimation de la sensibilité analytique (limite de détection), de la répétabilité et la de reproductibilité de la méthode ; la robustesse peut également être évaluée pour certaine technique ;
 - la maîtrise des risques à chaque étape du processus analytique du patient (prélèvement de l'échantillon) jusqu'à la communication des résultats d'analyse ;
- ➔ l'assurance qualité en ACP implique que tous les acteurs aient le même souci permanent de la meilleure exécution des actes à chaque étape de leur déroulement afin d'aboutir à la meilleure sécurité et à la meilleure rapidité des résultats. Adhérer à ce principe conduit à adopter à tous

⁴ https://www.has-sante.fr/jcms/p_3080503/fr/actes-de-preparation-qualification-et-selection-d-un-echantillon-tissulaire-ou-cellulaire-pour-analyse-de-genetique-somatique-des-cancers

les niveaux des règles de bonne pratique. L'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques⁵ (AFAQAP) se charge de définir des recommandations permettant un exercice optimal de la discipline. Ces recommandations sont évolutives, adaptées en fonction des progrès techniques, des connaissances médicales, de l'environnement social et législatif et constituent l'outil indispensable pour une meilleure qualité de prise en charge des actes d'anatomie et de cytologie pathologiques.

⁵ <https://www.afaqap.fr/lassociation/lanapath>

Introduction

Les tests de détection des mutations activatrices du gène EGFR codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur de l'*Epidermal Growth Factor* (EGFR-TK) et des mutations des gènes BRAF, NRAS, et KRAS sont des tests dits « compagnons » ou « théragnostiques », car ils sont associés à une thérapie ciblée dont la mise en œuvre dépend de leurs résultats. Ils permettent de détecter, dans la tumeur d'un patient, des mutations génétiques spécifiques, dont la présence éventuelle est prédictive de l'efficacité ou de la résistance au traitement selon les cas.

En 2019, la HAS a été saisie par l'Union nationale des caisses d'assurance maladie (UNCAM) afin de définir les conditions de réalisation de ces quatre tests compagnons ayant déjà fait l'objet d'avis du collège de la HAS favorables à leurs remboursements en 2014 et en 2015 [voir Annexes 1 à 4].

En effet, selon la procédure actuelle de la HAS, tout dossier de demande d'évaluation d'un médicament associé à un test compagnon doit comporter un document annexe [voir Annexe 9] permettant notamment de décrire les conditions de réalisation du test. Étant donné que l'entrée en vigueur de cette procédure date d'octobre 2018, les conditions de réalisation de ces quatre tests n'avaient pas été décrites lors de leurs évaluations.

Cette demande complémentaire de l'UNCAM, vise donc à décrire la population cible et les conditions de réalisation de ces quatre tests, en vue de permettre leur hiérarchisation et la mise en œuvre de la procédure de leur inscription sur la liste des actes et prestations. Actuellement, leur prise en charge a lieu *via* une inscription sur la Liste complémentaire (LC) d'actes de biologie médicale et d'anatomie et cytologie pathologiques (ACP).

En amont et en cohérence avec l'évaluation complémentaire de ces tests, le Service évaluation des actes professionnels (SEAP) de la HAS a procédé à l'évaluation d'une partie de la phase pré-analytique de ces tests. Il s'agit des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour l'analyse de génétique somatique des cancers correspondants (1). Le collège de la HAS a rendu un avis favorable à l'inscription de ces actes en décembre 2019⁶.

Ainsi, conformément à la note de cadrage de juillet 2020 publiée sur ce sujet (2), l'objectif de ce travail est de préciser les éléments complémentaires suivants :

- population cible du test compagnon ;
- conditions préalables de mise en œuvre du test ;
- conditions de réalisation du test et techniques à utiliser ;
- conditions d'interprétation et de communication des résultats du test ;
- rôles respectifs des intervenants à chacune des étapes ;
- conditions de formation, d'environnement et d'assurance qualité.

⁶ https://www.has-sante.fr/jcms/p_3143846/fr/avis-n-2019-0067/ac/seap-du-18-decembre-2019-du-college-de-la-has-relatif-a-l-inscription-sur-la-liste-des-actes-et-prestations-mentionnee-a-l-article-l-162-1-7-du-code-de-la-securite-sociale-de-l-acte-de-selection-et-preparation-d-un-echantillon-tissulaire-fixe-et-inclus-en-paraffine-pour-analyse-de-genetique-somatique-des-cancers

1. Présentation du thème

Depuis une dizaine d'années, la médecine de précision ou personnalisée a complété de manière effective l'arsenal permettant de traiter les cancers (3). Composée des thérapies ciblées et des immunothérapies, elle a permis des gains importants aussi bien en matière de pronostic –en adressant des cancers préalablement sans traitement– qu'en matière de qualité de vie –en réduisant les effets secondaires associées aux thérapies non spécifiques (4).

Ces nouvelles thérapies seules ou en associations avec des thérapies conventionnelles (chimiothérapies, radiothérapies ou chirurgies) nécessitent une parfaite caractérisation des statuts mutationnels des cellules cancéreuses (4). En effet si elles peuvent maximiser la probabilité de succès en agissant sur des cibles spécifiques, elles peuvent également conduire à un échappement tumoral et induire une aggravation pronostique (4).

1.1. La recherche de mutations en génétique somatique

Les tests de génétique sont des tests moléculaires utilisés pour la recherche et/ou l'identification d'éventuelles anomalies (e.g. mutations) situées au niveau de l'ADN. Contrairement aux tests de génétique constitutionnelle apportant des informations sur le patrimoine génétique transmissible présent dans toutes les cellules de l'organisme, les tests de génétique somatique permettent l'étude du génome des cellules tumorales.

Les tests de détection des mutations activatrices du gène codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur EGFR (EGFR-TK) et des mutations des gènes BRAF, NRAS, et KRAS sont des tests génétiques dits « compagnons » ou « théragnostiques », car ils sont associés à une thérapie ciblée⁷ dont la mise en œuvre dépend de leurs résultats. Ils permettent en effet de détecter, dans la tumeur d'un patient, des mutations génétiques spécifiques, dont la présence éventuelle est un indicateur prédictif de la réponse au traitement.

1.1.1. Voie de signalisation du facteur de croissance épidermique (EGF) et thérapies ciblées

L'EGF est un facteur de croissance dont la voie de signalisation joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire. Il est ainsi impliqué dans le développement et le fonctionnement normal des structures épithéliales de différents organes (e.g. peau, poumon, tractus gastro-intestinal ou encore système nerveux central).

Son récepteur, l'EGFR, est un récepteur transmembranaire qui possède une activité tyrosine kinase intrinsèque. Hors contexte oncologique, la fixation de l'EGF sur son récepteur entraîne sa dimérisation permettant la transduction du signal par activation du domaine intracytoplasmique tyrosine kinase. Cette activation va permettre une cascade de phosphorylation activant plusieurs voies de signalisation intracellulaires dont la voie RAS qui inclue la protéine RAF (voir Figure 1) (5) ; cela aboutit à une prolifération cellulaire normale.

La présence de mutation(s) sur les gènes codant pour la synthèse de protéines impliquées dans cette voie de signalisation conduit à une suractivité de la voie responsable d'un processus d'oncogénèse. Plusieurs mutations sont connues pour leur implication dans l'oncogénèse de nombreux types de

⁷ Une thérapie ciblée est un médicament anticancéreux qui cible un récepteur ou un mécanisme précis de la tumeur ; elle interagit avec des cibles moléculaires spécifiques nécessaires à la carcinogénèse et à la croissance tumorale et se distinguent ainsi des chimiothérapies traditionnelles (médicaments cytotoxiques) qui inhibent ou détruisent de manière non spécifique toutes les cellules se divisant rapidement y compris les cellules non tumorales.

cancer d'origine épithéliale ; c'est le cas notamment des mutations activatrices de l'EGFR-TK, des mutations des gènes codant pour les protéines NRAS ou KRAS et des mutations du gène codant pour les protéines B-RAF. Ces mutations représentent des cibles thérapeutiques pour les thérapies ciblées de la voie de l'EGF (5) qui se distinguent en deux classes pharmaco-thérapeutiques :

- les anticorps monoclonaux qui ont une action extracellulaire en empêchant l'interaction entre le facteur de croissance et son récepteur ; leur DCI (dénomination commune internationale) se termine par le suffixe « - mab » ;
- les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) qui ont une action intracellulaire en bloquant directement les voies de signalisation de l'EGFR ; leur DCI se termine par le suffixe « - nib ».

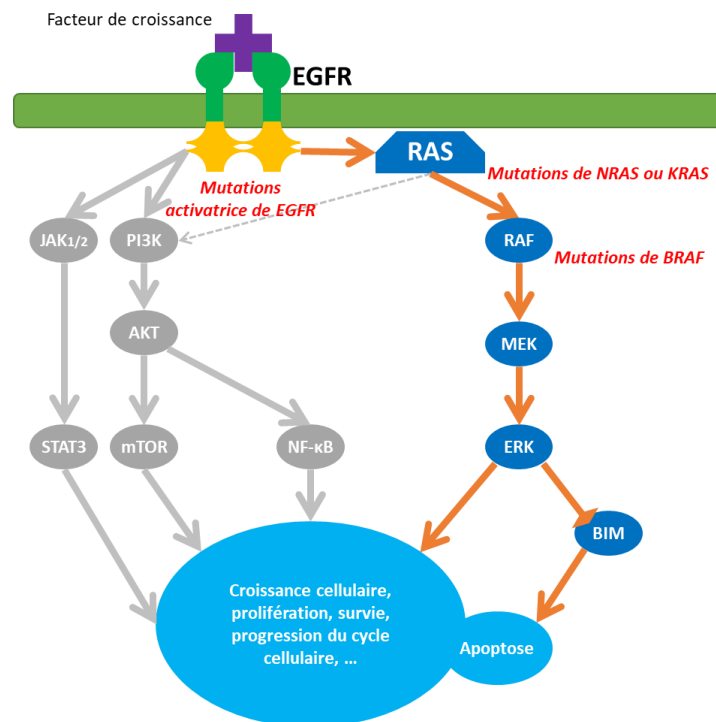


Figure 1 : Voie de signalisation de l'EGFR

La mutation du codon V600 du gène BRAF

Dans le mélanome, plusieurs types de mutations de la voie MEK (voir Figure 1) ou des voies collatérales (C-KIT) sont retrouvées mais les mutations affectant le gène BRAF sont les plus fréquentes (6). La substitution de la valine en position 600 par un glutamate (V600E) ou par une lysine (V600K) est celle qui est principalement retrouvée. Elle conduit à la formation de protéines kinases B-RAF constitutivement actives, c'est-à-dire capables d'entraîner la prolifération cellulaire en l'absence de fixation de l'EGF sur son récepteur EGFR. On compte actuellement huit mutations impliquant le codon 600 du gène BRAF dont sept actuellement décrites dans les mélanomes ; elles sont résumées dans le Tableau 1 ci-dessous.

Le ZELBORAF® (vémurafénib) et le TAFINLAR® (dabrafénib) appartiennent à la classe pharmaco-thérapeutique des ITK. Ils agissent en tant qu'inhibiteurs sélectifs des protéines kinases B-RAF et sont indiqués pour le traitement des patients atteints d'un mélanome non résecable ou métastatique porteur d'une mutation du gène BRAF (6).

Tableau 1 : Liste des mutations affectant le codon V600 du gène BRAF

Nom	Nature de la mutation	Type de cancer où la mutation est retrouvée
V600E (7-12)	Substitution d'une valine par un acide glutamique	Cancer colorectal Cancer papillaire de la thyroïde Mélanome Cancer du poumon Myélome Leucémie à tricholeucocytes
V600K (13)	Substitution d'une valine par une lysine	Mélanome
V600R (13)	Substitution d'une valine par une arginine	Mélanome
V600M (14, 15)	Substitution d'une valine par une méthionine	Mélanome Cancer de la prostate
V600D (9)	Substitution d'une valine par un acide aspartique	Mélanome Astrocytome/gangliogliome desmoplasique infantile
V600G (16, 17)	Substitution d'une valine par une glycine	Mélanome Cancer de l'endomètre
V600A (15)	Substitution d'une valine par une alanine	Cancer de la prostate
V600_K601de- linsE (18-20)	Mutation gain de fonction par délétion de deux acides aminées et insertion d'un acide glutamique	Cancer papillaire de la thyroïde Mélanome Cancer du pancréas

| La mutation activatrice de l'EGFR-TK

Les mutations de l'EGFR-TK peuvent conduire à une activation constitutive des voies de signalisation anti-apoptotique et de la prolifération cellulaire en l'absence d'EGF.

L'IRESSA® (géfitinib), le TARCEVA® (erlotinib) et le GIOTRIF® (afatinib) appartiennent à la classe pharmacothérapeutique des ITK. Ils agissent en tant qu'inhibiteurs sélectifs de la protéine kinase de l'EGFR. Ils sont indiqués dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) (21).

| Les mutations des gènes KRAS et NRAS

Retrouvées dans près de la moitié des cancers colorectaux, les mutations des gènes KRAS et NRAS conduisent à la synthèse de protéines KRAS et NRAS constitutivement actives en l'absence d'EGF et agissant en aval du récepteur EGFR.

Le Vectibix® (panitumumab) et l'Erbitux® (cétuximab) appartiennent à la classe pharmaco-thérapeutique des anticorps monoclonaux (de type recombinant pour Vectibix® et de type chimérique pour Erbitux®) dirigé contre l'EGFR. En se fixant spécifiquement sur ce récepteur, ces anticorps monoclonaux empêchent la liaison des ligands endogènes (EGF) et inhibent l'activation de la voie de signalisation en induisant l'internalisation de l'EGFR (22). Ainsi, toute mutation des gènes KRAS et NRAS entraîne l'inefficacité de ces traitement anti-EGFR en raison de leur activité située en aval de cette voie de signalisation. En d'autres termes, la présence d'une mutation des gènes KRAS ou NRAS constitue un facteur prédictif négatif de la réponse au traitement anti-EGFR.

1.1.2. La détection des mutations en génétique somatique

Les tests de génétique somatique font appel à différentes techniques de biologie moléculaire en fonction du type d'anomalies ou d'altérations moléculaires (mutations, translocations, amplifications, délétion/insertion) recherchées dans le tissu tumoral du patient.

Ainsi, si les techniques d'hybridation *in situ* (ISH-*In Situ Hybridization*) permettent par exemple d'identifier des anomalies telles qu'une amplification ou une translocation, le séquençage de l'ADN, qui consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné, est quant à lui utilisé depuis des dizaines d'années pour l'identification des mutations génétiques (23) ; la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est également largement utilisée pour la détection de mutation ponctuelle (24).

La méthode de séquençage Sanger

La méthode de séquençage Sanger est la plus ancienne (1977). Après avoir bénéficié de nombreuses améliorations au cours du temps, elle est toujours considérée comme une méthode standard pour la recherche de mutation en génétique somatique dans certains pays d'Europe (25).

Le principe de cette méthode consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN à partir d'une matrice (échantillon à analyser) amplifiée au préalable par PCR à laquelle est ajoutée un mélange réactionnel comprenant une amorce s'hybridant en 5' du fragment à séquencer et un ADN polymérase⁸ thermostable (Taq polymérase). Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP)⁹ et une faible concentration de didésoxynucléotides triphosphate (ddNTP) marqués par un fluorochrome spécifique sont ajoutés au mélange pour l'élongation de l'amorce. Le ddNTP diffère des dNTP par l'absence de OH en position 3' rendant leur liaison à un autre nucléotide impossible. Ainsi, lorsque l'ADN polymérase incorpore un ddNTP la synthèse du brin d'ADN s'arrête. On obtient ainsi la synthèse de plusieurs fragments d'ADN de taille différente qui sont ensuite séparés par migration dans les capillaires d'un séquenceur automatique. En regard des capillaires, un faisceau laser excite le fluorochrome des ddNTP et une caméra CCD (*charge coupled device*)¹⁰ capture l'émission de fluorescence amplifiée par un photomultiplicateur. L'électrophérogramme du patient est ainsi obtenu et est ensuite comparé à celui d'un sujet contrôle ou à une séquence de référence de manière à identifier la présence éventuelle d'une variation de séquence.

L'avantage de cette méthode réside dans sa capacité à détecter tous les types de mutations (substitutions, insertions et délétions d'un seul nucléotide) à partir d'un locus amplifié par PCR. Cependant, malgré les améliorations majeures (e.g. réduction des volumes de réactifs, augmentation de débit) apportées à la technique originale de la méthode de Sanger, elle reste considérée comme fastidieuse par rapport à d'autres méthodes (25).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ciblée

Depuis sa description en 1985 et la découverte en 1988 d'un ADN polymérase résistant aux températures élevées (la Taq polymérase), la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a révolutionné les

⁸ Un ADN polymérase est un complexe enzymatique intervenant dans la réplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire. Il synthétise l'ADN dans le sens 5' → 3', chez tous les organismes vivants en ajoutant des nucléotides à une extrémité hydroxyle libre, en général le 3'-OH du brin en cours de synthèse.

⁹ Le désoxyribonucléotide est l'unité élémentaire de l'ADN ; il est composé d'un résidu désoxyribose, d'un groupe phosphate et d'une des quatre bases nucléiques adénine (A), guanine (G), thymine (T) et cytosine (C). Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) sont ainsi le dATP, dGTP, dTTP, dCTP.

¹⁰ La caméra capture CCD est un type de capteur doté d'un récepteur à transfert de charge qui convertit un signal lumineux en un signal électrique.

méthodes d'analyse moléculaire et s'est imposée rapidement comme une technologie simple, particulièrement performante et accessible pour un grand nombre d'applications et de développements ; il existe à l'heure actuelle de très nombreuses variantes de cette technique (e.g. PCR-Multiplex¹¹, RT-PCR¹²...) pouvant être utilisées en association avec d'autres techniques tel que le séquençage (24).

Parmi les techniques de PCR, la PCR ciblée regroupe l'ensemble des techniques d'amplification des acides nucléiques utilisant des amorces spécifiques permettant de cibler la détection d'une ou plusieurs mutations génétiques d'intérêts d'où son utilisation en génétique somatique.

La PCR ciblée repose sur une succession de réaction enzymatique *in vitro* visant à amplifier une séquence spécifique d'ADN (l'amplicon) encadrée par des amorces spécifiques de 20 à 25 oligonucléotides au moyen d'un ADN polymérase thermostable dans une préparation où la température varie à l'aide d'un thermocycleur pour faire alterner trois phases :

- **la dénaturation** permettant de séparer l'ADN double brin en deux ADN simple brin, d'homogénéiser le milieu réactionnel et d'inhiber d'autres enzymes potentiellement présentes dans la solution ;
- **l'hybridation** où les amorces s'apparient spécifiquement avec leur brin d'ADN complémentaire ;
- **l'élongation**, où l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de chaque brin d'ADN matrice à partir des désoxyribonucléotides (dNTP) libres présents dans le milieu réactionnel.

A noter que la PCR peut être quantitative ; appelée alors PCR en temps réel, la quantité d'ADN polymérisé est mesurée à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Elle est dite semi-quantitative ou compétitive lorsque la quantité d'ADN est mesurée à différentes phases¹³ du cycle PCR puis comparée à un étalon interne (échantillon où la quantité d'ADN est connue) ajouté au milieu réactionnel.

Le séquençage de nouvelle génération (NGS)

Apparu à partir de 2005, le séquençage de nouvelle génération (NGS-*next generation sequencing*) ou séquençage haut débit est un terme regroupant différentes technologies hautement évolutives qui, à la différence du séquençage de Sanger, permettent le séquençage massif de plusieurs gènes et loci, voire du génome complet et permettent l'analyse de plusieurs échantillons à la fois.

Les technologies NGS se caractérisent par quatre étapes :

- **la préparation d'une librairie de séquençage** : créée en réalisant une fragmentation (par sonication ou par réaction enzymatique) aléatoire de l'ADN à séquencer suivie d'une ligation de petites séquences spécifiques (adaptateurs) à chaque extrémité du fragment ;
- **l'amplification clonale** réalisée *via* une PCR dont les amorces ciblent les adaptateurs ; elle permet de multiplier le nombre de fragments matriciels constituant la librairie ;
- **le séquençage** : l'ADN est séquencé en utilisant différentes approches en fonction de la technologie utilisée, généralement l'élongation se fait *via* l'addition de nucléotides marqués au fluorochrome dans le mélange réactionnel ;
- **le traitement des données de séquençage** est ensuite réalisé à l'aide d'outils informatiques. Cette étape consiste à concaténer par informatique l'ensemble des fragments obtenus pour

¹¹ La PCR multiplex permet en une seule réaction l'amplification de plusieurs amplicons qui seront détectés par des sondes spécifiques ou par leurs poids moléculaires.

¹² La RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) est une technique qui associe une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle synthétise le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant un ADN polymérase ARN dépendant (transcriptase inverse). Cet ADN complémentaire (ADNc) est généralement destiné à être amplifié par PCR.

¹³ On distingue plusieurs phases au cours de la PCR : la phase stationnaire où la quantité d'ADN augmente très lentement car il y a peu d'ADN matrice, la phase exponentielle correspondant à la phase de croissance rapide et la phase de plateau caractérisée par la diminution de la quantité de réactifs.

reconstituer le génome ou l'exome. La recherche des mutations se fait par comparaison des séquences de l'échantillons à la séquence sauvage.

Le NGS permet ainsi d'analyser simultanément un grand nombre de gènes en un temps très court ce qui constitue une avancée majeure en biologie moléculaire. Afin de favoriser le déploiement de cette technologie en génétique somatique, l'INCa a mis en place depuis 2013 un financement dédié à la structuration des laboratoires et au développement des compétences nouvelles nécessaires (validation de la technique, recrutement de bio-informaticiens) au sein des laboratoires de biologie moléculaire. Par ailleurs, depuis 2015, les tests par NGS ciblé sur panel de gènes, défini par un groupe d'experts de l'INCa, sont inscrits au référentiel des actes innovants hors nomenclature (RIHN) de la DGOS permettant ainsi leur prise en charge financière. Ces financements ont permis un transfert d'une partie significative de l'activité de génétique somatique des méthodes standards de biologie moléculaire vers le NGS. Ainsi en 2016, parmi 83 000 patients ayant bénéficié d'un test pour l'accès à une thérapie ciblée, 35 000 tests ont été réalisés par NGS (26).

1.2. Évaluation de la HAS

En 2014 et 2015, la HAS a rendu des avis favorables au remboursement des quatre tests compagnons dont l'indication et la thérapie ciblée qui leur sont associées sont résumées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Avis rendus par la HAS pour les quatre tests compagnons en fonction de l'indication et de la thérapie ciblée associée au test

Référence de l'avis HAS	Mutation recherchée par le test compagnon	Thérapie ciblée	Indication	SA (service attendu)	ASA (amélioration du service attendu)
2014.0117/AC/SEAP [Annexe 1]	Mutation activatrice de l'EGFR-TK	- IRESSA® (géfitinib) ; - TARCEVA® (erlotinib) ; - GIOTRIF® (afatinib)	Cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) localement avancé ou métastaté	Suffisant	IV (mineure) : - IRESSA®, - TARCEVA® - GIOTRIF®
2014.0118/AC/SEAP [Annexe 2]	BRAF V600	- ZELBORAF® (vémurafénib) ; - TAFINLAR® (dabrafénib)	Mélanome non résecable ou métastatique	Suffisant	III (modérée) : - ZELBORAF® - TAFINLAR®
2015.0014/AC/SEAP [Annexe 3]	KRAS	- VECTIBIX® (panitumumab) - ERBITUX® (cétuximab)	Cancer colorectal métastatique	Suffisant	IV (mineure) : - VECTIBIX® - ERBITUX®
2015.0013/AC/SEAP [Annexe 4]	NRAS	- VECTIBIX® (panitumumab)	Cancer colorectal métastatique	Suffisant	V (absence) : - VECTIBIX®

1.3. Prise en charge actuelle

Actuellement, la prise en charge de ces quatre tests s'effectue *via* une inscription sur la Liste complémentaire (LC) d'actes de biologie médicale et d'anatomie et cytologie pathologiques (ACP)¹⁴.

¹⁴ <https://solidarites-sante.gouv.fr/systeme-de-sante-et-medico-social/recherche-et-innovation/rihn>

2. Méthode d'évaluation

La méthode d'évaluation de ce rapport a été définie dans le document de cadrage (2) validé par le Collège de la HAS et publié en juillet 2020.

Elle consiste en une recherche systématique de la littérature synthétique et des recommandations de bonne pratique sélectionnée sur les critères explicites, et sur la consultation des organismes professionnels concernés par le sujet, interrogés comme parties prenantes afin de recueillir leur point de vue à titre collectif.

2.1. Objectifs de l'évaluation

Cette évaluation vise à préciser la population cible et les conditions de réalisation des quatre tests de détection des mutations activatrices du gène codant pour le domaine tyrosine kinase du récepteur EGFR (EGFR-TK) et des mutations des gènes BRAF, NRAS, et KRAS, en vue de permettre leur hiérarchisation et la mise en œuvre de la procédure de leur inscription sur la liste des actes et prestations.

2.2. Champ d'évaluation

Conformément à la demande de l'UNCAM, le présent rapport consistera à renseigner les éléments suivants :

- population cible du test compagnon ;
- conditions préalables de mise en œuvre du test ;
- conditions de réalisation du test et techniques à utiliser ;
- conditions d'interprétation et de communication des résultats du test ;
- rôles respectifs des intervenants à chacune des étapes ;
- conditions de formation, d'environnement et d'assurance qualité ;

Le Tableau 3 ci-après résume les indications, les actes (interventions) et les items à renseigner dans le cadre de ce travail.

Tableau 3 : Indications, actes (interventions) et critères à renseigner dans le cadre de cette évaluation

Intervention	Recherche de mutations activatrices de l'EGFR-TK	Recherche de mutations BRAF V600	Recherche de mutations KRAS	Recherche de mutations NRAS
Indications	CBNPC localement avancé ou métastasé conformément à l'AMM des traitements Iressa®, Tarceva® et Giotrif®	Mélanome non résectable ou métastatique conformément à l'AMM des traitements Zelboraf® et Tafinlar®	Cancer colorectal métastatique conformément à l'AMM des traitements Vectibix® et Erbitux®	Cancer colorectal métastatique conformément à l'AMM des traitements Vectibix®.
Critères à renseigner	<ul style="list-style-type: none"> - population cible du test ; - conditions préalables de mise en œuvre du test ; - conditions de réalisation et techniques à utiliser ; - conditions d'interprétation et de communication des résultats du test ; - rôles respectifs des intervenants à chacune des étapes ; - conditions de formation, d'environnement et d'assurance qualité. 			
Schéma d'étude	Tous documents disponibles publiés depuis 2012 évaluant et/ou décrivant les aspects organisationnels ainsi que la formations des opérateurs et l'assurance qualité.			

En amont et en cohérence avec l'évaluation complémentaire de ces tests, le SEAP a procédé à l'évaluation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour analyse de génétique somatique des cancers correspondants à une partie de la phase pré-analytique de ces tests (1). Le collège de la HAS a rendu un avis favorable à l'inscription de ces actes en décembre 2019 (27).

2.3. Recherche et sélection bibliographique

2.3.1. Recherche bibliographique

Une recherche bibliographique systématique a été réalisée, entre janvier 2018 et février 2020, dans les bases de données bibliographiques Medline, Cochrane Library, Lissa, Science direct (Elsevier) et sur les sites Internet des agences d'évaluation, des acteurs institutionnels du domaine de la santé, et des sociétés savantes compétentes dans le domaine étudié ; les recommandations de bonnes pratiques ont été recherchées sur les sites de l'INCa (Institut national du cancer) et des agences internationales spécialisées dans le cancer. Une veille bibliographique a été réalisée jusqu'en novembre 2020.

La stratégie de la recherche documentaire et les sites Internet consultés sont détaillés en Annexe 5. Cette recherche bibliographique a permis d'identifier 96 documents.

2.3.2. Sélection bibliographique

Un premier tri des 96 documents identifiés, sur titre et résumé, a permis de sélectionner 72 publications en lien avec le sujet de cette évaluation.

Parmi ces publications, toutes celles évaluant et/ou décrivant les aspects organisationnels des tests de recherche de mutation en génétique somatique ainsi que la formations des opérateurs et l'assurance qualité ont été sélectionnées pour une lecture *in extenso*.

Au total, 12 références ont été sélectionnées dans ce rapport (voir Annexe 6). Il s'agit notamment de guide méthodologique et/ou de bonne pratique disponibles sur le site de l'INCa (28, 29), de rapport d'évaluation de la HAS (1), ainsi que de référentiels édités par le Réseau régional de cancérologie d'Occitanie (30), par l'Agence du numérique en santé (ANS) (31) ou encore par la COFRAC (32-34). Une recommandation nord-américaine (35) et trois articles portant notamment sur les aspects techniques des tests de génétique somatique ont également été sélectionnés (25, 36, 37).

2.4. Sollicitation des parties prenantes

2.4.1. Liste des organismes sollicités

S'agissant d'un travail dont l'objectif est de décrire les conditions de réalisation d'actes très techniques, seul le point de vue des spécialités impliquées dans leur réalisation/utilisation a été recherché.

Les deux organismes ainsi sollicités relèvent du champ disciplinaire de l'anatomie et cytologie pathologiques (ACP) et de la génétique moléculaire, ils sont présentés dans le Tableau 4 ci-après.

Tableau 4 : Liste des organismes consultés

Discipline	Organisme
Médecin spécialisé en anatomie et cytologie pathologiques (ACP)	Conseil national professionnel des pathologistes (CNPath)
Biologiste médical spécialisé en biologie moléculaire	Groupe francophone de cytogénomique oncologique (GFCO)

2.4.2. Méthode de consultation

Ces organismes ont été sollicités en tant que « parties prenantes » au sens de la charte de l'expertise sanitaire annexée au décret n°2013-413 du 21 mai 2013¹⁵, dans le cas présent comme groupes professionnels concernés en pratique par les conséquences de ce rapport, c'est-à-dire par la réalisation ou la prescription des actes évalués dans ce rapport. Ils devaient à ce titre représenter et exprimer l'intérêt général de leurs membres. Cette sollicitation a été menée conformément à la procédure de consultation des parties prenantes mise en place par la HAS¹⁶.

En pratique, les présidents du CNPath et du GFCO ont été directement sollicités afin que le groupe professionnel qu'ils représentent exprime son point de vue argumenté. A cette fin, l'annexe du dossier pharmaceutique qui est actuellement en vigueur dans le cadre de l'évaluation des tests compagnons, leur a été adressée.

Cette consultation a été conduite entre le 31 octobre 2019 et le 06 janvier 2020. Les réponses des deux parties prenantes sont présentées *in extenso* en Annexe 9. Leurs différents points de vue ont ensuite été synthétisés par la HAS dans la partie 3.4 de ce rapport.

2.5. Point de vue des patients

Étant donné le caractère très technique de cette évaluation, il n'a pas été jugé pertinent de solliciter les associations de patients.

¹⁵ Le quatrième alinéa de ce décret dispose que : « La décision peut s'appuyer, si l'objet de l'expertise le justifie, sur la prise en compte des points de vue des « parties prenantes » (ou « parties intéressées »), c'est-à-dire des personnes ou groupes concernés ou susceptibles de l'être, directement ou indirectement, par les conséquences de cette décision, notamment des milieux associatifs et des acteurs économiques ou professionnels, ou qui représentent l'intérêt général de groupes concernés par ces conséquences ».

¹⁶ Décision n°2014.0115/DC/MJ du 28 mai 2014 du collège de la Haute Autorité de santé portant adoption de la procédure de consultation des parties prenantes. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-09/c_2014_0115_adoption_procedure_parties_prenantes.pdf

3. Résultats de l'évaluation

3.1. Population cible des tests compagnons

3.1.1. Test de détection des mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK

➔ Population cible

Conformément à l'avis rendu en 2014 [voir Annexe 1] par la HAS dans les indications des AMMs des traitements IRESSA® (géfitinib) (38), TARCEVA® (erlotinib) (39) et GIOTRIF® (afatinib) (40), la recherche de la mutation activatrice de l'EGFR-TK est indiquée chez les patients présentant un CBNPC localement avancé ou métastasé.

➔ Évolution de l'activité de génétique somatique depuis 2008 dans la recherche de la mutation activatrice de l'EGFR-TK dans le cancer du poumon (tests réalisés sur les tumeurs) (voir Figure 2)

Selon les données de l'INCa, issues des plateformes de génétique moléculaires des cancers (41), l'activité de génétique somatique dans le cancer du poumon n'a cessé d'augmenter entre 2008 et 2016, puis après une certaine stabilité entre 2016 et 2017, cette activité a subi une nette baisse en 2018 où 22 361 patients ont bénéficié d'une recherche de mutations activatrices du gène EGFR contre 28 151 en 2017. Ce différentiel de 5 790 patients, peut s'expliquer, selon l'INCa, par la hausse concomitante de la recherche de ce type de mutations sur ADN tumoral circulant en 2018 (réalisé chez 5 621 patients) par rapport à 2017 (pas d'effectif fourni).

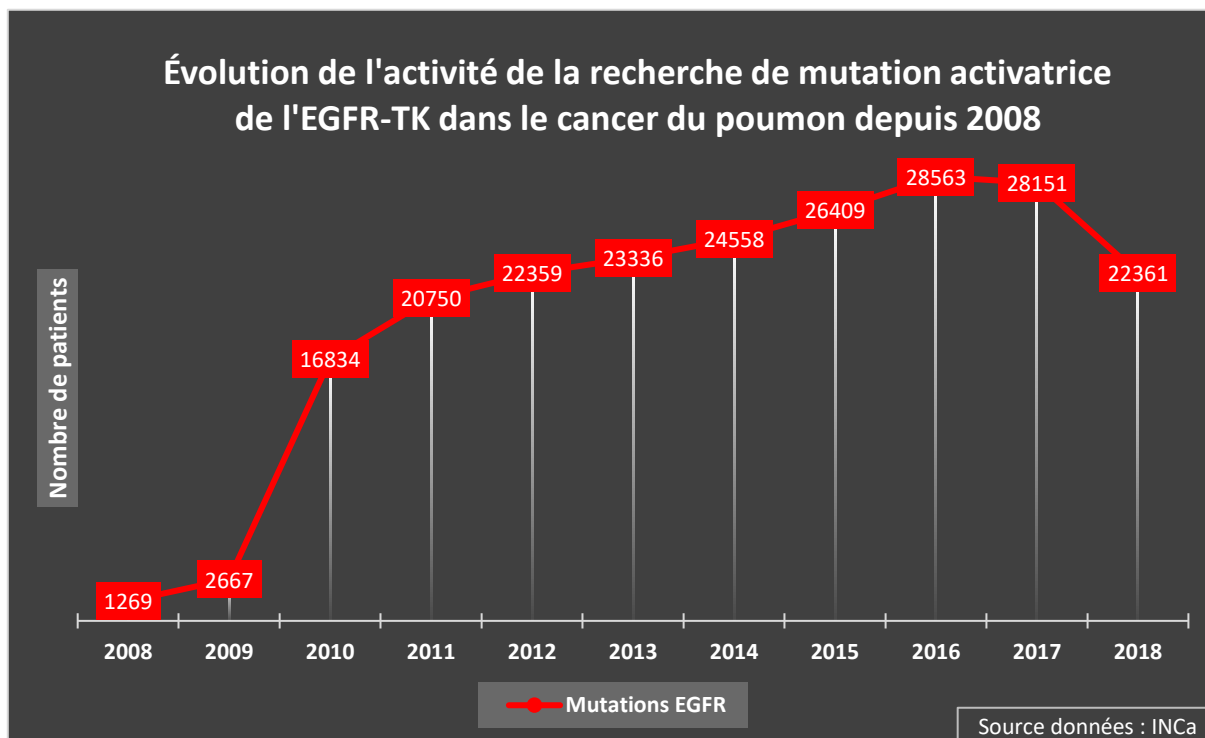


Figure 2 : Évolution de l'activité de la recherche de la mutation activatrice de l'EGFR-TK dans le cancer du poumon (tests réalisés sur les tumeurs) depuis 2008 (source des données : Inca, 2020 (41))

3.1.2. Test de détection de la mutation V600 du gène BRAF

→ Population cible

Conformément à l'avis rendu en 2014 par la HAS [voir Annexe 2] dans les indications des AMMs des traitements TAFINLAR® (dabrafénib) (42) et ZELBORAF® (vémurafénib) (43), la recherche de la mutation BRAF V600 est indiquée chez les patients présentant un mélanome non résecable ou métastatique.

Selon l'INCa, l'incidence des patients atteints d'un mélanome non résecable ou métastatique a été estimée à environ 1 773 patients en 2015 (44).

→ Évolution de l'activité de recherche de la mutation du gène BRAF dans le mélanome cutané depuis 2010 (voir Figure 3)

Selon les données de l'INCa, issues des plateformes de génétique moléculaire des cancers (44), l'activité de génétique somatique dans le mélanome cutané n'a cessé d'augmenter depuis 2010 et reste relativement stable depuis 2014. En 2018, 6 142 patients atteints de mélanome cutané ont bénéficié d'une recherche de mutations BRAF ; la technologie par NGS a été utilisée chez 59 % (n=3 623) de ces patients.

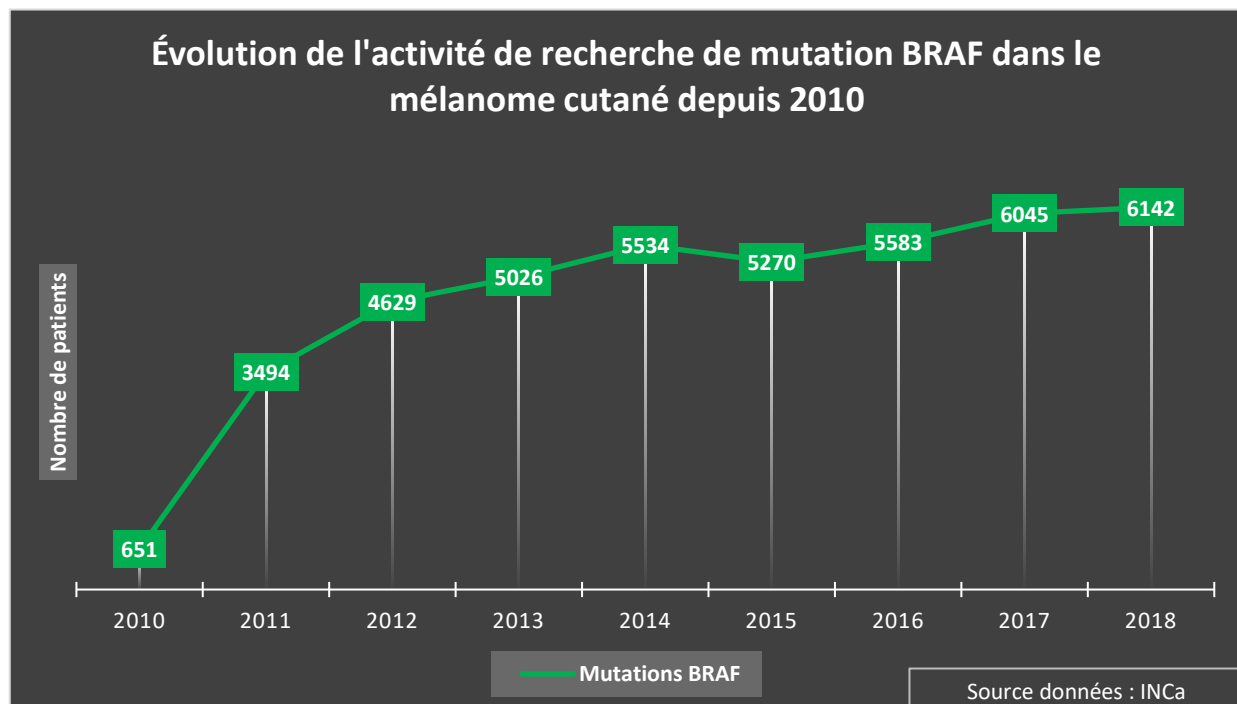


Figure 3 : Évolution de l'activité de recherche de la mutation du gène BRAF dans le mélanome cutané depuis 2010 (source des données : Inca, 2020 (44))

3.1.3. Tests de détection des mutations des gènes KRAS et NRAS

→ Population cible

Conformément aux avis rendus en 2015 [voir Annexe 3 et Annexe 4] par la HAS dans les indications des AMMs des traitements VECTIBIX® (panitumumab) (45) et ERBITUX® (cétuximab) (46), la recherche de mutations des gènes KRAS et NRAS est indiquée chez les patients présentant un cancer colorectal métastatique.

En l'absence de cette mutation (statut KRAS et NRAS sauvage), la prescription de Vectibix® ou d'Erbitux® est indiquée.

- ➔ Évolution de l'activité de recherche de mutation des gènes KRAS (depuis 2007) et NRAS (depuis 2013) dans le cancer colorectal (voir Figure 4)

Selon les données de l'INCa (47), la recherche des mutations de l'exon 2 de KRAS était en augmentation de 2007 jusqu'en 2014 où une phase de stabilisation a été observée ; une diminution de l'activité est relevée depuis 2017 avec 19 915 patients testés et 18 362 patients en 2018.

Concernant la recherche de mutation NRAS, les données disponibles depuis 2013, montrent également une baisse d'activité depuis 2017, avec 18 536 patients testés en 2017 et 16 333 patients testés en 2018.

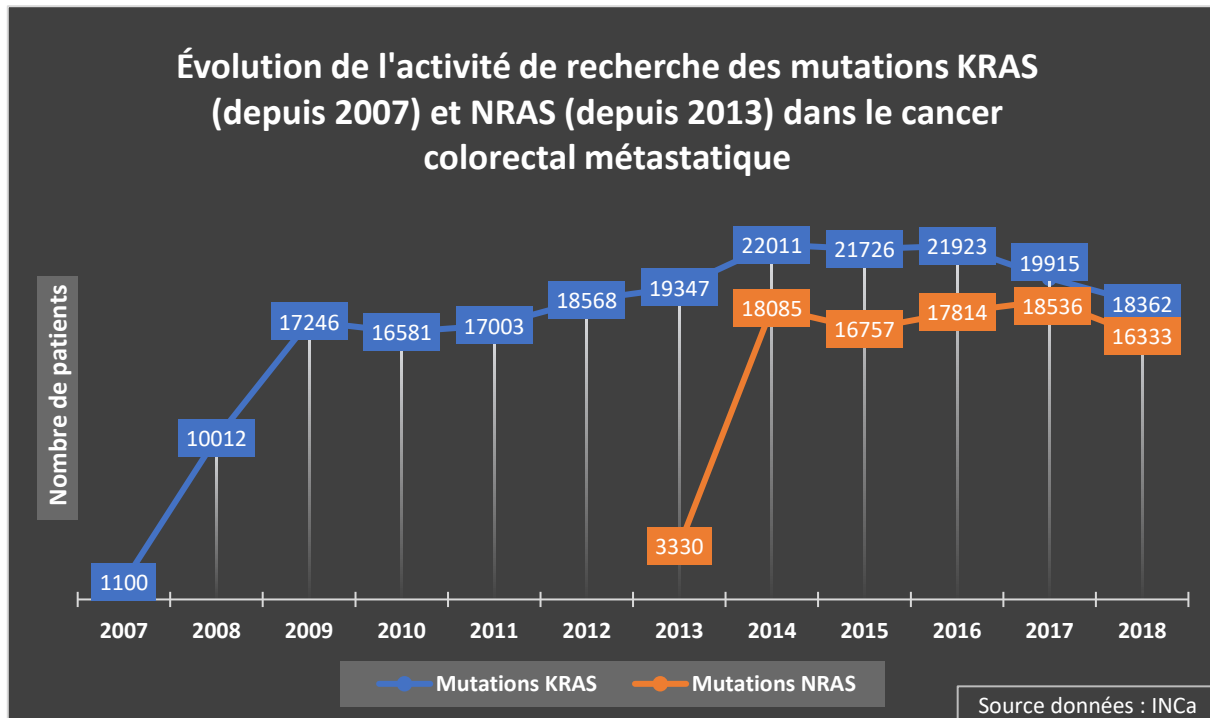


Figure 4 : Évolution de l'activité de recherche des mutations KRAS (depuis 2007) et NRAS (depuis 2013) dans le cancer colorectal (source des données : Inca, 2020 (47))

Le test de recherche des mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK :

- ➔ est indiqué chez les patients présentant un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) localement avancé ou métastasé conformément à l'avis rendu en 2014 par la HAS selon l'AMM des traitements IRESSA® (géfitinib), TARCEVA® (erlotinib) et GIOTRIF® (afatinib), inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) du récepteur EGFR ;
- ➔ ce test a été réalisé chez 22 361 patients atteints de cancer du poumon en 2018 selon les données de l'INCa.

Le test de recherche de la mutation V600 du gène BRAF :

- ➔ est indiqué chez les patients présentant un mélanome non résecable ou métastatique conformément à l'avis rendu en 2014 par la HAS selon l'AMM des traitements AFINLAR® (dabrafénib) et ZELBORAF® (vémurafénib), inhibiteurs de la sérine-thréonine kinase BRAF ;
- ➔ ce test a été réalisé chez 6 142 patients atteints de mélanome cutané en 2018 selon les données de l'INCa.

Les tests de recherche de mutations du gène KRAS et NRAS :

- sont indiqués chez les patients présentant un cancer colorectal métastatique conformément aux avis rendus en 2015 par la HAS selon l'AMM des traitements VECTIBIX® (panitumumab) et ERBITUX® (cétuximab), anticorps monoclonaux anti-EGFR ;
- ces tests ont été réalisés chez 18 362 patients pour la recherche de mutation KRAS et chez 16 333 patients pour la recherche de NRAS en 2018 selon les données de l'INCa.

Voici l'évolution de l'activité de génétique somatique en France pour ces quatre tests compagnons traités dans ce rapport (source de données : INCa, 2020)

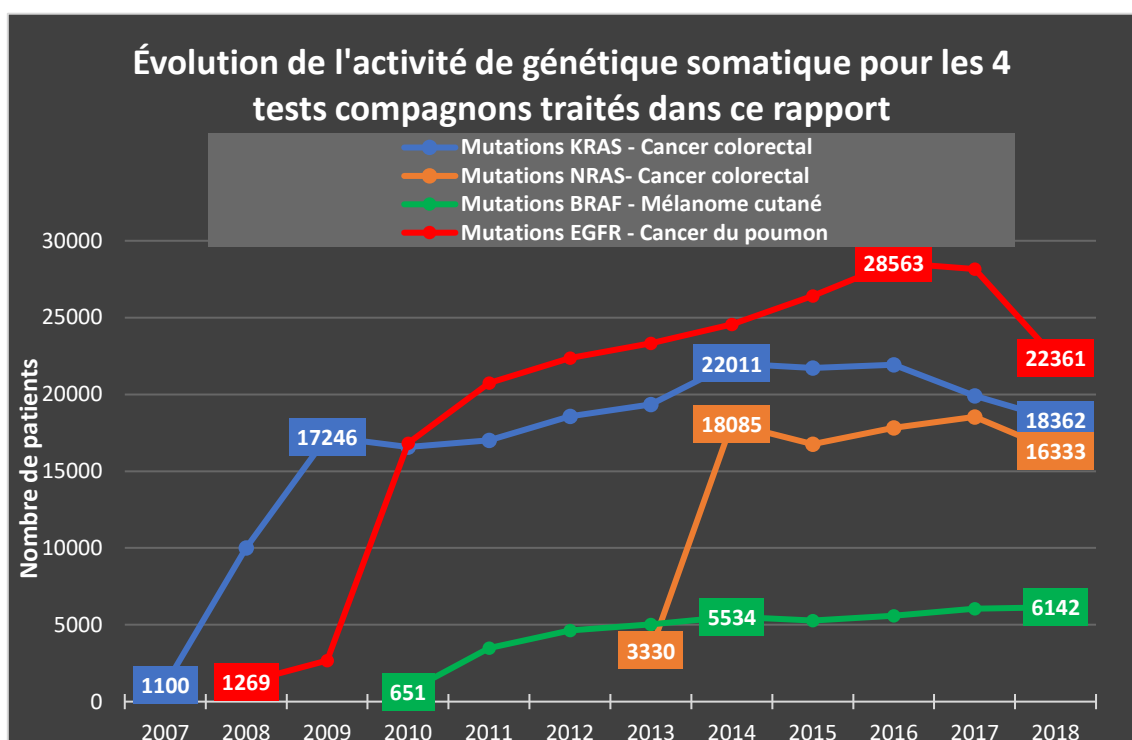


Figure 5 : Évolution de l'activité de génétique somatique en France pour les quatre tests compagnons (source de données : INCa, 2020)

3.2. Conditions préalables de mise en œuvre des tests

La prescription d'un test de recherche de mutations des gènes EGFR-TK, BRAF, KRAS et NRAS peut être réalisée soit au moment du diagnostic de la pathologie cancéreuse, soit à distance du diagnostic selon l'évolution de la maladie.

Les tests moléculaires peuvent être prescrits par le médecin clinicien en charge du patient (e.g. un oncologue, un spécialiste d'organe), par le médecin ACP responsable du diagnostic ou encore par un médecin de la RCP¹⁷ (Réunion de concertation pluridisciplinaire) qui évalue l'éligibilité du patient à l'examen (23, 31).

¹⁷ La RCP est une réunion collégiale entre médecins de différentes spécialités complémentaires (oncologues, radiologues, anatomo-cyto-pathologistes et parfois biologistes, etc.). Conformément à l'article D6124-131 du Code de la santé publique « le projet thérapeutique envisagé pour chaque patient atteint de cancer pris en charge ainsi que les changements significatifs d'orientation thérapeutique sont enregistrés en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) » ;

3.3. Conditions de réalisation d'un test compagnon

Les tests compagnons évalués dans ce rapport sont effectués par des techniques de biologie moléculaire qui est une branche spécialisée de la biologie médicale.

Selon l'article L6211-2 du Code de la santé publique¹⁸, un examen de biologie médicale se déroule en trois phases :

- **la phase pré-analytique**, comprenant le prélèvement d'un échantillon, le recueil des éléments cliniques pertinents, la préparation, le transport et la conservation de l'échantillon biologique jusqu'à l'endroit où il est analysé ;
- **la phase analytique**, correspondant au processus technique permettant l'obtention d'un résultat d'analyse biologique ;
- **la phase post-analytique**, comprenant la validation, l'interprétation et la communication des résultats au prescripteur et au patient, dans un délai compatible avec l'état de l'art.

Les tests moléculaires sont des examens de biologie médicale effectués par des laboratoires de biologie médicale et d'ACP.

Depuis 2006, l'INCa a mis en place, avec le ministère de la santé, une organisation spécifique au niveau national permettant d'assurer une équité d'accès aux tests moléculaires pour tous les patients quel que soit leur établissement de prise en charge (CHU, CH, établissements privés, CLCC¹⁹) et quelle que soit la technologie devant être utilisée. Il existe ainsi 28 plateformes de génétique moléculaire réparties sur tout le territoire français.

Ces plateformes regroupent chacune plusieurs laboratoires capables de suivre les évolutions technologiques afin de pouvoir garantir l'accessibilité des traitements innovants à l'ensemble des patients avec une sécurité maximale et dans un délai compatible avec la mise en place du traitement.

3.3.1. Phase pré-analytique

La phase pré-analytique du test est assurée par un médecin ACP. C'est une étape très importante dans la réalisation du test moléculaire car la qualité de sa mise en œuvre influe de façon majeure sur la qualité des résultats.

3.3.1.1. Prélèvement de l'échantillon

La recherche de mutations s'effectue sur tout type de prélèvement contenant des cellules tumorales tel qu'une biopsie, une pièce opératoire obtenue suite à la résection chirurgicale d'une tumeur, ou encore une cytologie tumorale (e.g. liquide pleural pour la recherche des mutations EGFR dans les carcinomes bronchopulmonaires).

Le prélèvement peut être obtenu au moment du diagnostic initial ou à distance, aussi bien sur la tumeur primitive que sur la métastase (28).

À noter, l'utilisation récente de l'ADN tumoral circulant (ADNct) qui permet, à partir d'un simple prélèvement sanguin (plasma) de déterminer le statut mutationnel d'un patient atteint d'une tumeur solide ; cela correspond à la biopsie liquide. Ce type de prélèvement est essentiellement utilisé pour la

¹⁸ https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000021684284?init=true&page=1&query=Article+L6211-2++Code+de+la+sant%C3%A9+publique&searchField=ALL&tab_selection=all&anchor=LEGIARTI000021708778#LEGIARTI000021708778

¹⁹ CLCC : centre de lutte contre le cancer.

recherche des mutations EGFR dans les cancers du poumon lorsque l'échantillon de la tumeur n'est pas analysable (e.g. matériel est épuisé ou non informatif, nouvelle biopsie impossible) (30, 38).

D'après les données de l'INCa (48), 11 412 patients atteints d'un cancer du poumon ont bénéficié d'une recherche de mutation (EGFR, KRAS, BRAF et HER2) sur biopsie liquide en 2018.

3.3.1.2. Préparation, qualification et sélection de l'échantillon tissulaire ou cellulaire en anatomo-cyto-pathologie

Afin de garantir un résultat d'analyse optimal de l'échantillon prélevé, la HAS a réalisé, en 2019, l'évaluation de deux actes portant sur la préparation, la qualification et la sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour l'analyse de génétique somatique des cancers (1) :

- **concernant la préparation de l'échantillon**, la HAS préconise, selon le type de tumeur à analyser, soit la méthode de fixation en formol tamponné à 10 % suivie d'une inclusion en paraffine (FFPE) (acte N005), soit la cryoconservation (acte N006) ; ces deux méthodes sont réalisables pour les indications des quatre tests compagnons faisant l'objet de ce rapport. A noter qu'une préparation adéquate de l'échantillon permettra de garantir l'intégrité de l'ADN à analyser ;
- **l'étape de la qualification de l'échantillon** est soit réalisée par le médecin ACP responsable du diagnostic, soit par le médecin ACP responsable de la qualification de l'échantillon au sein de la plateforme de génétique moléculaire. Cette étape correspond à un contrôle macroscopique (e.g. nature, taille de la tumeur) et microscopique sur lame de l'échantillon. Elle permet notamment d'identifier la présence d'éventuels facteurs confondants (e.g. nécrose, cellules stromales, fibrose, ...) et de **déterminer la cellularité tumorale** correspondant au pourcentage de cellules tumorales présent sur l'ensemble de l'échantillon. En cas de cellularité tumorale jugée insuffisante, il est préférable de réaliser une macro-²⁰ ou une microdissection du prélèvement ;
- à l'issue de cette étape de qualification, **la sélection des échantillons** destinés à l'analyse génétique est réalisée. L'échantillon sélectionné doit être le plus riche possible en cellules tumorales, car sa contamination par du tissu non tumoral entraîne une dilution du pourcentage d'allèles mutés diminuant de ce fait la sensibilité du test. **La teneur en cellules tumorales doit être supérieure à la limite de détection du test ou/ de la technique d'analyse utilisée.**

Une fois la préparation et la sélection de l'échantillon réalisées, celui-ci est transmis aux professionnels qui effectuent l'analyse de biologie moléculaire. Les conditions de transport doivent alors répondre aux exigences définies dans le rapport de la HAS de 2019 (1) et faire l'objet d'un contrôle systématique.

L'ensemble des données décrivant la réalisation de la phase pré-analytique décrite ci-dessus, tout comme les données d'identification du patient et du pathologiste ayant réalisé l'examen, doivent figurer dans un compte-rendu destiné au laboratoire réalisant l'analyse de l'échantillon. Ces données seront intégrées dans le CR final de l'examen de génétique somatique des cancers.

3.3.2. Phase analytique : la recherche des mutations

Le biologiste médical ou le médecin ACP est responsable du choix de la technique d'analyse et de la validation des résultats.

3.3.2.1. Extraction des acides nucléiques du tissu fixé

La première étape consiste en l'extraction des acides nucléiques du tissu fixé (tissu FFPE ou cryoconservé).

²⁰ La macro-dissection est une séparation par découpage méthodique de l'échantillon sans utilisation d'un microscope.

Les procédés d'extraction sont très variables et le choix de la technique est réalisé notamment en fonction du type de prélèvement, et de la technique de biologie moléculaire qui sera utilisée ultérieurement. A noter qu'il existe également de nombreux « kits » d'extraction commercialisés permettant d'obtenir des ADNs de qualité acceptable.

Quel que soit le procédé d'extraction utilisé, il consiste en une lyse des cellules obtenue à l'aide de solvant ou par la chaleur (cette étape permet le déparaffinage des échantillons FFPE), une élimination des protéines (e.g. digestion protéique par protéinase K²¹) suivie d'une dernière étape de purification et de concentration de l'ADN (e.g. par précipitation ou à l'aide de colonne d'affinité) (36).

Après extraction, une mesure de la quantité d'ADN extraite et de la contamination en protéine peut être réalisée *via* un dosage au spectrophotomètre ou par fluorimétrie. Cependant, cette mesure ne permet pas de préjuger de la qualité de l'ADN extrait et ne doit pas être utilisée comme critère de rejet des échantillons (29).

3.3.2.2. Techniques d'analyse moléculaire

Selon les données de la littérature (25, 37), il n'existe pas de technique de référence pour la recherche de mutations en génétique somatique qui fait appel à différentes techniques de biologie moléculaire reposant essentiellement sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et sur le séquençage des acides nucléiques.

Étant donné qu'une grande variété de méthodes peuvent être utilisées pour l'analyse des mutations, il est très important que les laboratoires vérifient leur reproductibilité, leur robustesse et leur précision ; seules les méthodes validées peuvent être utilisées par les laboratoires (voir 3.3.5).

Selon l'INCa (29), les cinq techniques les plus répandues pour la recherche de mutations en génétique somatique sont :

- Pour le séquençage :
 - ➔ **le séquençage de Sanger** (voir section 1.1.2) ;
 - ➔ **le pyroséquençage** : cette technique permet d'effectuer un séquençage rapide et à moindre coût par rapport à un séquençage par la méthode de Sanger (25) notamment car elle ne nécessite pas de clonage de la séquence à analyser. Cette technique permet le séquençage par quantification d'un signal lumineux émis lors de l'incorporation d'un nucléotide. Contrairement à la méthode de Sanger, l'incorporation des nucléotides pour l'élongation du brin d'ADN complémentaire de la matrice se fait l'un après l'autre. Les nucléotides non incorporés (non complémentaires) sont dégradés par une enzyme (apyrase), et la réaction peut reprendre avec un nouveau nucléotide. Lorsque la Taq polymérase incorpore le nucléotide attendu, cela entraîne la libération d'un pyrophosphate qui est alors transformé en ATP. Du fait de la présence d'une luciférine et d'une luciférase ajoutée dans le milieu réactionnel, l'ATP agit comme substrat de la réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase qui convertit la luciférine en oxyluciférine. Le signal lumineux généré est détecté par un capteur CCD qui le traduit sous forme d'un pic dont la hauteur est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés. La taille des pics du pyrogramme permet ainsi de déduire la séquence d'ADN obtenue.

- Pour les techniques impliquant la PCR (voir section 1.1.2) :

²¹ L'extraction à l'aide de protéinase K (digestion protéique) est une étape longue pour laquelle il faut compter environ 15 heures en moyenne.

- ➔ **la technique *High Resolution Melting* (HRM)** ou courbe de fusion à haute résolution : le principe est d'observer la fusion de l'ADN en temps réel en chauffant progressivement l'échantillon d'ADN double brin à analyser dans lequel des colorants fluorescents ont été intercalés. Les brins d'ADN se séparent en ADN simples brins au fur et à mesure du chauffage entraînant une diminution de la fluorescence qui permet d'établir une courbe de fusion. Un changement de la séquence d'ADN entraîne une modification de sa cinétique de fusion qui sera détectée en comparaison à l'ADN normal. L'HRM ne permettant pas d'identifier précisément la nature des modifications de la séquence détectées, il est nécessaire de confirmer ces résultats par une autre technique permettant l'identification de la mutation ;
- ➔ **la technique d'expansion d'amorce Snapshot** : elle est basée sur la technique de PCR et la technique de séquençage de Sanger. Elle consiste en une polymérisation *in vitro* d'un ADN complémentaire d'une matrice amplifiée par PCR. L'incorporation d'un ddNTP marqué au fluorochrome entraîne l'arrêt de l'élongation. Les produits de la réaction d'extension sont analysés après séparation par électrophorèse capillaire et détection de la fluorescence ;
- ➔ **la PCR quantitative utilisant des sondes fluorescentes Taqman®** : elle repose sur la réalisation d'une PCR en temps réel utilisant deux sondes fluorescentes qui diffèrent uniquement d'un nucléotide et qui sont complémentaires soit de l'allèle muté recherché soit de l'allèle sauvage. Alors que la Taq polymérase élonge l'amorce et synthétise le brin néoformé de l'extrémité 3' vers 5' du brin complémentaire, l'activité exonucléase 5'-3' de cette même Taq polymérase dégrade la sonde déjà hybridée au brin matrice libérant le fluorophore. Le signal fluorescent permet alors de mettre en évidence et de quantifier un allèle muté par rapport à un allèle sauvage.

À noter l'utilisation actuellement en plein essor des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) (voir section 1.1.2) qui permettent de séquencer simultanément un grand nombre de gènes, voire le génome complet et qui pourraient progressivement remplacer les méthodes actuelles dans les années à venir (25, 37).

3.3.3. Phase post-analytique

3.3.3.1. Interprétation des résultats

Le biologiste médical ou le médecin ACP responsable de l'analyse effectue l'interprétation et la validation des résultats qu'il consigne dans le compte-rendu de l'examen de génétique moléculaire (CR-GM). L'interprétation du test s'appuie sur les informations fournies dans le cadre de la prescription (renseignements cliniques, antécédents) et sur les données d'anatomo-pathologie issues de la phase pré-analytique (voir 3.3.1 phase pré-analytique). De plus, l'interprétation des résultats doit reposer sur des données bibliographiques issues d'indications ou de recommandations d'institutions ou de sociétés savantes, de préférence nationales quand elles existent ; ces références bibliographiques, ainsi que leurs règles d'utilisation, doivent être documentées (32).

Il est possible que des résultats soient techniquement non interprétables (par exemple, à cause de la faible quantité d'ADN extraite, ou d'une mauvaise qualité ne permettant pas l'amplification). Dans ce cas, il est recommandé de confirmer ce résultat par un test indépendant. Si l'analyse est à nouveau non contributive, un compte-rendu est édité en ce sens et une nouvelle analyse sur un autre prélèvement est demandée (28).

En 2011, le taux de données non interprétables était compris entre 2 et 11 % pour les quatre mutations concernées par le présent rapport (49).

3.3.3.2. Communication des résultats

En conformité avec l'article D6211-3 du Code de la santé publique²², la communication des résultats se fait au médecin prescripteur et au patient.

La diffusion du CR-GM est initiée par le laboratoire ou la plateforme de biologie moléculaire *via* un échange par messagerie électronique sécurisée ou par sa mise en partage dans le DMP (dossier médical partagé). Le CR-GM est à destination du médecin prescripteur qui peut être, pour rappel, le médecin ACP responsable du diagnostic, le(s) médecin(s) clinicien(s) en charge du patient ou les professionnels de santé de la RCP. L'original du compte-rendu est conservé sur la plateforme de génétique moléculaire.

Le résultat du test génétique permet au(x) médecin(s) de statuer sur la stratégie thérapeutique à adopter ; cette prise de décision est souvent réalisée au cours d'une RCP. Après cette étape, le médecin clinicien responsable de la prise en charge du patient, lui fait part, au cours d'une consultation, des résultats du test génétique et du choix thérapeutique qui en découle. A noter qu'en cas de mise en partage du CR-GM *via* le DMP, celui-ci reste inaccessible au patient jusqu'à ce que les résultats lui soient communiqués en consultation (31).

3.3.3.3. Délai de rendu des résultats

Les résultats des tests moléculaires de génétique somatique doivent être mis à disposition des cliniciens dans les délais les plus courts possibles pour pouvoir éclairer la prise de décision thérapeutique. Ce délai est en moyenne de l'ordre de deux à trois semaines à compter de la date de prescription (28).

Aussi, le processus d'obtention d'un résultat et la transmission du compte-rendu doivent être effectués dans un délai maximum de sept à dix jours ouvrables après réception du prélèvement par la plateforme ou le laboratoire de biologie médicale (25, 28, 35).

À noter que seuls les biologistes médicaux, les médecins spécialistes qualifiés en ACP et les internes en DES de biologie médicale ou d'ACP peuvent autoriser la communication du compte-rendu (32).

3.3.3.4. Éléments devant figurer dans le compte-rendu de génétique moléculaire (CR-GM)

Un modèle de CR-GM est mis à la disposition des professionnels de santé sur le site de l'INCa (50) (voir Annexe 7).

Il doit comporter les éléments suivants :

- l'identification du patient ;
- les données relatives à la prescription (identification du prescripteur, contexte clinique de la demande) ;
- les renseignements d'ACP issues de la phase pré-analytique comprenant notamment l'identification du pathologiste, la description du prélèvement et le pourcentage de cellules tumorales présentes dans l'échantillon (cellularité tumorale) ;
- la description des méthodes utilisées lors des phases pré-analytique et analytique (notamment mention de la sensibilité analytique de la technique d'analyse) ;
- les résultats de l'analyse ; ils sont hiérarchisés en fonction de l'impact théragnostique des mutations identifiées. Ces dernières sont notées selon la nomenclature internationale *Human Genome Variation Society* (HGVS) ;

²² https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000032788198/#:~:text=I.,r%C3%A9sultat%20communiqu%C3%A9%20de%20l'examen

- la conclusion et l'interprétation des résultats ; l'interprétation est indispensable et doit établir l'association mutation/sensibilité à la thérapie ciblée sans dicter le traitement.

3.3.4. Récapitulatif des acteurs et de leur rôle aux différentes étapes de réalisation du test compagnon

La Figure 6 ci-dessous résume le rôle respectif des différents intervenant à chacune des étapes de réalisation d'un test compagnon.

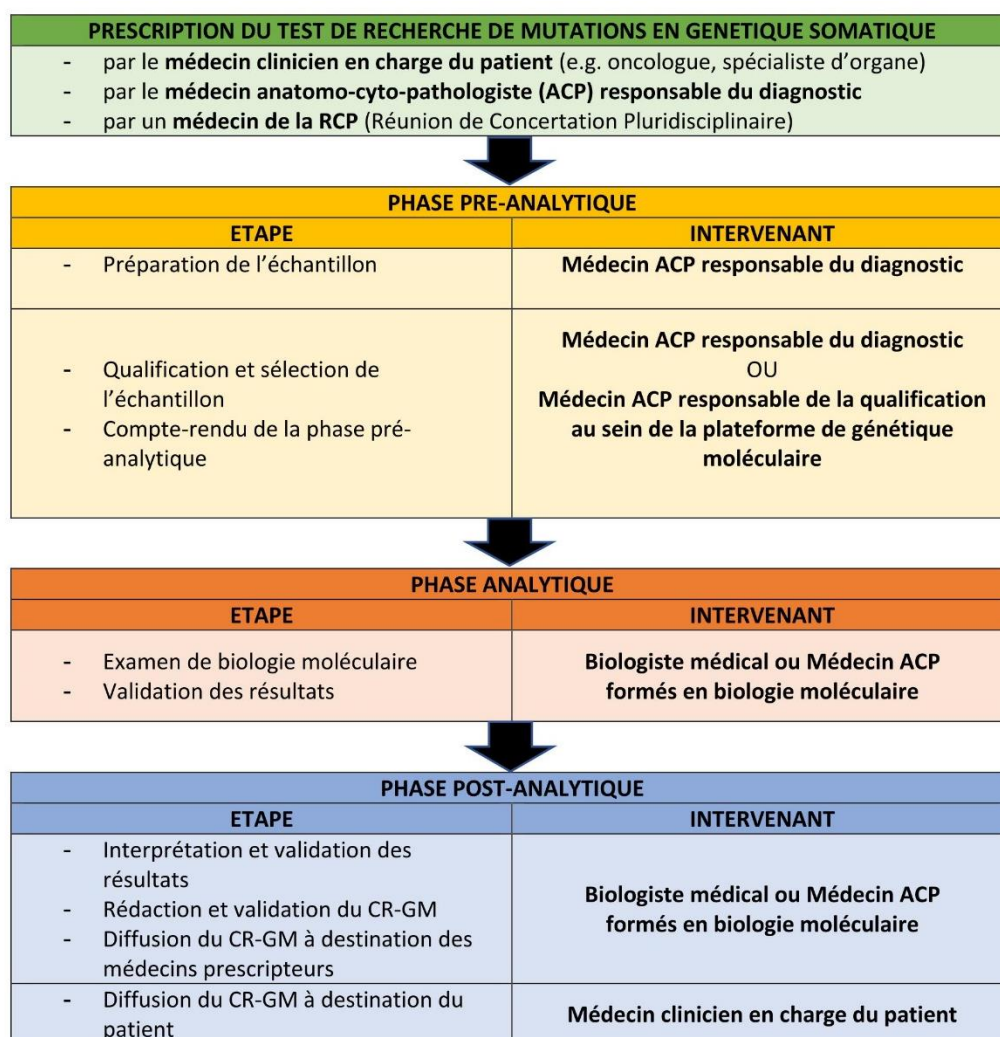


Figure 6 : Récapitulatif des acteurs et de leur rôle aux différentes étapes de réalisation du test compagnon

À noter que les internes en DES de biologie médicale (ou d'ACP) peuvent être autorisés, dans le cadre de leur cursus de formation, à valider et interpréter les résultats des examens de biologie médicale (ou d'ACP) sous la responsabilité du biologiste-responsable (ou du pathologiste-responsable). Le laboratoire conserve la traçabilité du nom du biologiste médical (ou du médecin spécialiste qualifié en ACP) par délégation duquel et sous la responsabilité duquel un interne agit (32).

3.3.5. Contrôle qualité

Conformément à la loi en vigueur, tous les laboratoires de biologie médicale doivent être accrédités avant le 1er novembre 2021 par le Comité français d'accréditation (COFRAC) dans le cadre de la réforme de la biologie médicale.

A noter que les actes d'ACP considérés comme une discipline différente de la biologie médicale ont d'abord été exclus de cette accréditation en 2013²³. C'est seulement depuis juin 2020²⁴, que l'accréditation porte sur la totalité de l'activité de biologie médicale incluant l'activité d'ACP (phase pré-analytique) réalisée en génétique somatique dès lors que les examens figurent soit à la nomenclature des actes de biologie médicale, soit à la nomenclature générale des actes professionnels.

Selon l'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques²⁵ (AFAQAP), l'assurance qualité en ACP implique que tous les acteurs aient le même souci permanent de la meilleure exécution des actes à chaque étape de leur déroulement afin d'aboutir à la meilleure sécurité et à la meilleure rapidité des résultats. Adhérer à ce principe conduit à adopter à tous les niveaux des règles de bonne pratique. L'AFAQAP se charge de définir des recommandations permettant un exercice optimal de la discipline. Ces recommandations sont évolutives, adaptées en fonction des progrès techniques, des connaissances médicales, de l'environnement social et législatif et constituent l'outil indispensable pour une meilleure qualité de prise en charge des actes d'anatomie et de cytologie pathologiques.

Pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale, le COFRAC (32) suit les critères de la norme ISO 15189 correspondant à la norme de qualité internationale de référence pour les laboratoires de biologie médicale. Elle est devenue obligatoire depuis novembre 2016 en France pour qu'un laboratoire de biologie puisse continuer à réaliser et à transmettre des résultats d'analyse.

L'objectif de cette démarche est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par un laboratoire de biologie médicale. En effet, le résultat d'un test de génétique somatique constitue une information décisive pour le choix thérapeutique des patients. Il est donc indispensable de s'assurer de la qualité de ces tests afin d'éviter au maximum les résultats faux positifs ou faux négatifs qui pourraient générer une perte de chance pour les patients ou les exposer inutilement à des effets secondaires.

Dans ce cadre, un dossier de validation de méthode de génétique somatique doit être réalisé par le laboratoire de biologie médicale pour chaque technique. Un document destiné à accompagner les laboratoires de biologie moléculaire dans cette démarche a été publié par l'INCa en septembre 2014 (29).

La première étape dans la constitution de ce dossier consiste à définir de manière précise les activités pour lesquelles le laboratoire demande l'accréditation ; il s'agit de la portée d'accréditation. En génétique somatique, le choix se porte généralement vers une portée d'accréditation dite flexible standard (A) dans la mesure où elle permet à la structure d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques déjà démontrées, et d'utiliser, sous accréditation, entre deux visites d'évaluation du COFRAC, les révisions successives de ces méthodes. À noter qu'en cas d'utilisation de méthode CE-IVD²⁶, le laboratoire se doit de respecter scrupuleusement le mode opératoire défini par le fabricant. Le laboratoire peut également opter pour une demande d'accréditation en portée

²³ Loi n° 2013-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale. JournalOfficieldelaRépubliqueFranc,aise.31mai 2013:1—140. <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000027478077/>

²⁴ https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000042012463/

²⁵ <https://www.afaqap.fr/lassociation/lanapath>

²⁶ Marquage CE pour les dispositifs de diagnostic *in vitro*.

flexible étendue (B), s'il souhaite, en plus des possibilités offertes par la portée flexible standard (A), la possibilité, entre deux visites d'évaluation du Cofrac, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'elle a adaptées ou développées (33, 34).

La technique d'analyse moléculaire est ensuite décrite selon le formulaire COFRAC SH FORM 43 (voir Annexe 8) synthétisant l'ensemble des items nécessaires à la présentation des données de vérification et de validation de la méthode. Ce formulaire comporte plusieurs feuillets :

- les feuillets 1 et 2 destinés à la description de la méthode (e.g. principe, type d'échantillon, prétraitement de l'échantillon, type d'étalonnage, réactifs etc...)
- les feuillets 3 et 4 destinés à la maîtrise des risques. Cette démarche correspond à une analyse de risque. Elle consiste dans un premier temps à identifier les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure puis, à déterminer le caractère significatif ou non significatif de cette influence. La preuve de la maîtrise des facteurs ayant une influence significative sur les résultats devra être apportée. L'analyse des risques ne concernent pas seulement la technique d'analyse mais englobe la totalité des éléments intervenant dans le processus d'examen, du patient jusqu'au résultat d'analyse à savoir :
 - la matière ou l'échantillon (e.g. type, modalités de prélèvement, identitovigilance, délai d'acheminement, contamination) ;
 - le milieu (e.g. conditions de conservations des échantillons, contamination, exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur) ;
 - le matériel, avec d'une part l'équipement (e.g. contaminations, maintenance des appareils) et d'autre part les réactifs (e.g. conservations et conditions d'utilisation, gestion des stocks) ;
 - la méthode d'analyse (e.g. limites de détection, de quantification, risque d'interférence, cause d'incertitude de mesures) ;
 - le personnel (formation, compétence et maintien de compétence du personnel) ;
- les feuillets suivants (5 à 8) sont destinés à l'évaluation des performances de la méthode évaluées par le laboratoire.

L'évaluation des performances de la méthode se fonde notamment sur l'évaluation de ses capacités métrologiques qui, pour les techniques utilisées en génétique somatique, se caractérise principalement par la sensibilité analytique, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode d'analyse en raison de l'aspect qualitatif (présence ou absence de mutation) du résultat qu'elles fournissent; la robustesse peut également être évaluée pour certaine technique (28, 29).

➔ La sensibilité analytique

Elle se définit par la limite de détection (LOD). Afin de la déterminer, il est recommandé d'utiliser une gamme d'ADN extrait de lignées cellulaires présentant la ou les mutations recherchées. Le résultat de cette sensibilité analytique doit être indiqué dans le CR-GM. La teneur en cellules tumorales de l'échantillon analysé doit être supérieure à la LOD du test ou/ de la technique d'analyse utilisée.

La LOD recommandée pour une application diagnostique de la technique est de 20-25 % de cellules tumorales. En d'autres termes, cela signifie que pour être validée, la technique d'analyse doit permettre de détecter et d'identifier les altérations somatiques si elles sont présentes dans au moins 20 à 25 % des cellules de l'échantillon.

➔ La répétabilité

L'évaluation de la répétabilité peut être réalisée en comparant les résultats (muté/non muté) sur au moins trois échantillons en triplicat.

→ La reproductibilité

L'évaluation de la reproductibilité consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes au cours du temps ; elle peut être établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations différentes et deux niveaux minimum de mutations (*i.e.* un échantillon avec un faible pourcentage d'allèle muté et un échantillon fortement muté).

→ La robustesse

Elle se définit par la capacité d'une méthode à donner des résultats proches en présence de changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de la procédure.

Pour vérifier la maîtrise du processus analytique en continu, le contrôle interne de qualité (CIQ) peut être réalisé à l'aide d'échantillons contrôles qui seront analysés simultanément à la mesure d'échantillons biologiques des patients ; l'interprétation des résultats se fera ensuite en fonction des limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli.

En plus du contrôle interne de qualité (CIQ), les laboratoires sont soumis à des évaluations externes de la qualité (EEQ) par des organismes certifiés. Depuis 2012, le programme Gen&Tiss (50) a été mis en place pour l'EEQ des examens de génétique moléculaire sur tissus tumoraux. Ce programme réunit notamment l'AFAQAP (Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques), le GFCO (Groupe francophone de cyto-génomique oncologique) et des laboratoires de références.

3.3.6. Synthèse des conditions de réalisations des tests de recherche de mutations des gènes de l'EGFR -TK, BRAF, KRAS et NRAS

Les tests de recherche de mutations des gènes EGFR-TK, BRAF, KRAS et NRAS peuvent être prescrits par le médecin clinicien en charge du patient, par le médecin ACP responsable du diagnostic ou encore par un médecin de la RCP conformément aux indications correspondant à l'AMM des thérapies ciblées auxquels ils sont associés.

Ces tests sont des examens de biologie moléculaire effectués par des laboratoires de biologie médicale et/ou d'anatomie et cytologie pathologiques (ACP) spécialisés. Il existe actuellement en France, 28 plateformes de génétique moléculaire réparties sur tout le territoire permettant d'assurer une équité d'accès à ces tests pour tous les patients quel que soit leur établissement de prise en charge et quelle que soit la technologie devant être utilisée.

Comme tout examen de biologie moléculaire, les tests de recherche de mutations en génétique somatique comportent trois phases : pré-analytique, analytique et post-analytique.

La phase pré-analytique est réalisée par un médecin ACP

C'est une étape très importante dans la réalisation du test moléculaire car la qualité de sa mise en œuvre influe de façon majeure sur la qualité des résultats.

Cette phase comprend plusieurs étapes :

- le prélèvement de l'échantillon s'effectuant sur tout type de tissu ou liquide biologique contenant des cellules tumorales aussi bien sur la tumeur primitive que sur la métastase ;**

- la préparation/conditionnement de l'échantillon, qui selon le rapport d'évaluation de la HAS²⁷, s'effectue soit par la méthode de fixation en formol suivie d'une inclusion en paraffine (acte N005), soit par la cryoconservation (acte N006) ; une préparation adéquate de l'échantillon permettra de garantir l'intégrité de l'ADN à analyser ;
- la qualification de l'échantillon correspondant à un contrôle macroscopique (e.g. nature, taille de la tumeur) et microscopique de l'échantillon. Elle permet notamment d'identifier la présence d'éventuels facteurs confondants (e.g. nécrose, cellules stromales, fibrose, ...) et surtout de déterminer la cellularité tumorale (pourcentage de cellules tumorales présent sur l'ensemble de l'échantillon). En cas de cellularité tumorales jugées insuffisantes, une macro ou une micro-dissection peut être réalisée pour l'optimiser ;
- la sélection des échantillons destinés à l'analyse. L'échantillon sélectionné doit être le plus riche possible en cellules tumorales dont la teneur doit être de l'ordre de 20 à 25 %, toujours supérieure à la limite de détection de la technique d'analyse utilisée.

La phase analytique est réalisée par le biologiste médical ou le médecin ACP formés en biologie moléculaire

Cette phase comprend une première étape d'extraction des acides nucléiques du tissu fixé (FFPE ou cryoconservé) grâce à un processus de lyse cellulaire, d'élimination des protéines puis de purification /concentration de l'ADN à analyser.

Le biologiste médical ou le médecin ACP, formés en biologie moléculaire choisissent ensuite la technique d'analyse. Il n'existe pas de technique de référence pour la recherche de mutations en génétique somatique. Selon l'INCa, les cinq techniques les plus répandues reposent essentiellement sur les techniques de séquençage (méthode de Sanger, pyroséquençage) et sur des techniques impliquant la réalisation d'une PCR (la technique High Resolution Melting, la Snapshot, et la technique Taqman®). A noter l'utilisation actuellement en plein essor des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS).

La phase post-analytique est réalisée par le biologiste médical ou le médecin ACP formés en biologie moléculaire.

Cette phase comprend l'interprétation, la validation et la communication des résultats.

L'interprétation des résultats du test s'appuie notamment sur les informations cliniques fournies dans le cadre de la prescription et sur les données d'ACP issues de la phase pré-analytique. En cas de résultats techniquement non interprétables (e.g. à cause de la faible quantité d'ADN extraite, ou d'une mauvaise qualité ne permettant pas l'amplification), il est recommandé de confirmer ce résultat par un test indépendant. Si l'analyse est à nouveau non contributive, un compte-rendu est édité en ce sens et une nouvelle analyse sur un autre prélèvement est demandée.

La communication des résultats est initiée par le laboratoire ou la plateforme de biologie moléculaire via la transmission d'un compte-rendu adressé au médecin prescripteur qui peut

²⁷ Haute Autorité de Santé. Évaluation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour analyse de génétique somatique des cancers. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2019. https://has-sante.fr/jcms/p_3080503/fr/evaluation-des-actes-de-preparation-et-de-qualification-d-un-echantillon-tissulaire-ou-cellulaire-en-anatomocytopathologie-pour-l-analyse-en-genetique-somatique-des-cancers-feuille-de-route?portal=p_3058934

être le médecin ACP responsable du diagnostic, le(s) médecin(s) clinicien(s) en charge du patient ou les professionnels de santé de la RCP.

Le compte-rendu de génétique moléculaire (CR-GM) doit comporter les données d'identification du patient, les données relatives à la prescription (identification du prescripteur, contexte clinique de la demande), les données d'ACP issues de la phase pré-analytique notamment l'estimation de la cellularité tumorale, ainsi que les méthodes utilisées et leurs caractéristiques (e.g. limite de détection).

Les résultats de l'analyse sont présentés de manière qualitative (présence ou absence de mutation) et les mutations identifiées sont notées selon la nomenclature internationale Human Genome Variation Society (HGVS). Il est indispensable de faire figurer l'interprétation et la conclusion des résultats qui doit établir l'association mutation/sensibilité à la thérapie ciblée sans dicter le traitement.

Le résultat du test génétique va permettre au(x) médecin(s) de statuer sur la stratégie thérapeutique à adopter ; cette prise de décision est souvent réalisée au cours d'une RCP.

La communication des résultats au patient se fait après cette étape, par son médecin clinicien qui lui fait part au cours d'une consultation, des résultats du test génétique et du choix thérapeutique qui en découle. Le délai de rendu des résultats doit être le plus court possible pour pouvoir éclairer la prise de décision thérapeutique puis initier sans retard le traitement.

Assurance qualité

Chaque méthode d'analyse de génétique somatique utilisée par le laboratoire doit faire l'objet d'un dossier de validation de la méthode reposant essentiellement sur l'évaluation des performances analytiques de la technique et sur la maîtrise des risques à chaque étape du processus analytique.

L'évaluation des performances de la méthode se fonde notamment sur l'évaluation de ses capacités métrologiques qui, pour les techniques utilisées en génétique somatique, se caractérise principalement par la sensibilité analytique (limite de détection), la répétabilité et la reproductibilité de la méthode d'analyse en raison de l'aspect qualitatif (présence ou absence de mutation) du résultat qu'elles fournissent ; la robustesse peut également être évaluée pour certaine technique. À noter que la limite de détection recommandée pour une application diagnostique de la technique est de 20 à 25 % de cellules tumorales.

Afin de vérifier la maîtrise du processus analytique en continu, un contrôle interne de qualité (CIQ) est réalisé à l'aide d'échantillons contrôles qui sont analysés simultanément avec les échantillons biologiques des patients ; l'interprétation des résultats se fait ensuite en fonction des limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli.

Les laboratoires sont également soumis à des évaluations externes de la qualité (EEQ) réalisées par des organismes certifiés ; le programme Gen&Tiss, initié par l'Institut National du Cancer (INCa), réunit dans ce cadre l'AFAQAP (Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques), le GFCO (Groupe francophone de cytogénomique oncologique) et des laboratoires de référence.

3.4. Synthèse de la position des professionnels

Le CNPath et le GFCO ont été sollicités pour apporter leurs positions respectives sur la définition des conditions de réalisation des tests de détection des mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK et des mutations des gènes BRAF, NRAS et KRAS.

Une synthèse des principaux éléments de réponse apportés par ces deux organismes est présentée ci-dessous.

3.4.1. Concernant la population cible des tests

Les parties prenantes sollicitées se sont basées sur les données récentes de l'INCa (présentées dans la section 3.1 de ce rapport) pour donner une estimation du nombre d'actes prévisionnels pour la recherche des mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK et des mutations des gènes BRAF, NRAS et KRAS. A noter que ces estimations prennent en compte des indications ne faisant pas l'objet de ce rapport.

- ➔ Concernant le test de détection des mutations activatrices de l'EGFR-TK dans le CBNPC, le GFCO estime que le nombre d'acte prévisionnel est au minimum de 20 000/an en prenant en compte le nombre de décès annuels par cancer du poumon en France (environ 33 000 cas actuellement) et le fait que 60 % de ces patients soient porteurs d'une tumeur de type CBNPC non épidermoïde. Le GFCO explique l'écart avec les données de l'INCa (environ 28 000 cas en 2017) par l'addition d'indications annexes telles que le suivi des patients ayant une mutation sous traitement ITK.
- ➔ Concernant le test de détection des mutations V600 du gène BRAF pour lequel le volume d'acte est de l'ordre de 6 000 dans l'indication du mélanome cutané (données INCa), les professionnels indiquent que ce chiffre peut être augmenté de 20 000 à 60 000 actes supplémentaires si l'on considère les autres indications pour ce test (cancer du côlon, cancer de la thyroïde, ou encore myélome).
- ➔ Concernant les tests de détection des mutations du gène KRAS et NRAS dans le cancer colorectal métastatique, les professionnels estiment un volume d'acte prévisionnel de l'ordre de 20 000 à 25 000 par an (*versus* 18 362 KRAS et 16333 NRAS – INCa 2018 ; section 3.1.3) en se basant sur les données épidémiologiques du cancer colorectal, soit une incidence estimée à 41 558 cas en 2018 dont 50 % des cas correspondent à un stade métastatique. Les professionnels ont précisé que ce volume d'actes pouvait être de l'ordre de 12 000 pour la recherche de mutation NRAS, si celle-ci est réalisée de manière séquentielle par rapport à KRAS ; ces deux mutations étant mutuellement exclusives.

3.4.2. Concernant les conditions préalables de mise en œuvre des tests

Les professionnels indiquent que la prescription des tests devrait être conforme aux conditions de prescription définies dans l'AMM des médicaments qui leur sont associés.

3.4.3. Concernant les conditions de réalisation d'un test compagnon

Dans l'ensemble, les réponses des professionnels sollicités étaient en adéquation avec les données issues de la littérature présentée dans la section 3.3 de ce rapport.

3.4.3.1. Phase pré-analytique

Les parties prenantes consultées soulignent l'importance de la qualité du prélèvement tissulaire (exérèse ou biopsie) effectué, en milieu hospitalier public ou privé, par un chirurgien, un oncologue, un pneumologue, ou encore par un radiologue qualifié. Ils précisent que des informations et des consignes sous forme de manuels de prélèvements et manuels de qualité sont largement diffusées auprès des préleveurs afin de les accompagner dans leur processus de gestion des risques, notamment en ce qui concerne les conditions de transport.

Concernant l'étape de préparation et de sélection des échantillons, le CNPath a indiqué que les laboratoires suivent les recommandations de la HAS²⁸, ainsi que les recommandations et évaluations externes de qualité (EEQ) émises par les organismes certifiés (Gen&Tiss, AFAQAP). Les professionnels ont notamment cité l'utilisation de la fixation au formol suivie de l'inclusion en paraffine pour la préparation de l'échantillon. Ils ont également souligné l'importance de l'évaluation de la cellularité tumorale au sein de la zone d'intérêt dont le choix incombe uniquement au médecin pathologiste, celui-ci pouvant recouper les échantillons (macro- ou microdissection) en vue d'optimiser la cellularité tumorale.

3.4.3.2. Phase analytique

Selon les parties prenantes consultées, cette phase peut être réalisée par un biologiste moléculaire, un technicien de laboratoire, un assistant-ingénieur ou un ingénieur sous la responsabilité du biologiste médical ou du médecin ACP qui valide les résultats. Le personnel de laboratoire effectuant les tests moléculaires doit préalablement recevoir une formation spécifique à la réalisation de techniques de génétique moléculaire.

Le CNPath rappelle que le test de génétique somatique est réalisé dans le cadre d'une plateforme de biologie moléculaire intégrée à un CHU ou un CH, à un centre de lutte contre le cancer, un établissement de santé privé d'intérêt collectif (ESPIC), un laboratoire de biologie médicale privé ou encore un cabinet médical de pathologie privé. Le GFCO précise que seuls les laboratoires de biologie médicale ou de pathologie ayant les compétences et les équipements nécessaires sont habilités à pouvoir réaliser les tests de biologie moléculaire.

➔ Aspect technique

Les professionnels ont rappelé le principe de l'extraction d'ADN (lyse cellulaire, élimination des protéines, purification/concentration ADN) de l'échantillon constituant la première étape de la phase analytique.

Concernant la technique d'analyse, les parties prenantes consultées n'ont pas désigné de technique de référence. Selon le CNPath, la PCR ciblée permet une détection sélective des mutations connues *a priori* et consiste à quantifier le nombre d'amplicon correspondant à une portion d'ADN définie par un couple d'amorces sur un gène cible ; cette quantification est réalisée par le suivi quantitatif d'ADN cible synthétisé au cours de la réaction de PCR. Le CNPath a indiqué que différentes techniques de PCR ciblée sont utilisées (voir 1.1.2), elles nécessitent un temps de manipulation relativement réduit et elles permettent l'obtention d'un résultat fiable et univoque à condition que les contraintes de qualité pré-analytiques soient respectées.

Le CNPath a décrit deux types de méthodes :

²⁸ Haute Autorité de Santé. Évaluation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour analyse de génétique somatique des cancers. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2019. https://has-sante.fr/jcms/p_3080503/fr/evaluation-des-actes-de-preparation-et-de-qualification-d-un-echantillon-tissulaire-ou-cellulaire-en-anatomocytopathologie-pour-l-analyse-en-genetique-somatique-des-cancers-feuille-de-route?portal=p_3058934

- des méthodes manuelles mises au point au sein des laboratoires de génétique somatique. La technique de PCR nécessite alors i/ un thermocycleur permettant d'amplifier l'ADN (production d'amplicons) en faisant varier la température de façon précise selon des cycles itératifs et ii/ d'un système de mesure/détection des amplicons faisant intervenir une phase de capture des amplicons puis iii/ une hybridation avec une sonde spécifique marquée (avidine/biotine, phosphatase alcaline, peroxydase) avec séparation des sondes liées et libres ;
- des méthodes partiellement ou totalement automatisées au moyen de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DM-DIV). Ainsi, il existe de nombreuses méthodes commercialisées pouvant prendre en charge de manière automatique soit l'intégralité des étapes de PCR (extraction d'ADN, amplification et détection des amplicons), soit uniquement les étapes d'amplification et de détections des amplicons, l'étape d'extraction d'ADN étant alors réalisée manuellement.

Le CNPath indique que la durée totale du processus analytique peut aller de 2h30 à 24h selon la technique utilisée.

➔ Validation de la méthode

Concernant la phase analytique, le CNPath rappelle l'importance de bien maîtriser les étapes de manipulations de l'échantillon, le stockage des réactifs et le suivi continu des performances de la méthode utilisée par exemple à l'aide de contrôles internes d'amplification et de témoins positifs et négatifs.

Les deux parties prenantes sollicitées ont rappelé que chaque méthode utilisée pour le test moléculaire doit être vérifiée et/ou validée dans le cadre de l'accréditation COFRAC ISO 15 189.

3.4.3.3. Phase post-analytique

➔ Conditions d'interprétation

Les professionnels indiquent que l'interprétation des résultats du test doit être réalisée en prenant en considération les données de traçabilité (identification du patient, description du prélèvement), les données cliniques (contexte clinique, diagnostic histologique), ainsi que les données anatomopathologiques correspondant à la phase pré-analytique du test (fixateur, cellularité tumorale, présence de facteurs confondants éventuels, ...).

Les professionnels ont indiqué que dans certaines circonstances les résultats peuvent être non interprétables du fait, d'une mauvaise qualité de la fixation de l'échantillon, d'une cellularité tumorale trop faible, ou encore d'une quantité ou concentration d'ADN extraite insuffisante. En s'appuyant sur les données de l'INCA le GFCO et le CNPath ont rapporté respectivement un taux de 5 % et 2,7 % d'examen non-contributifs. Le CNPath a souligné toutefois la difficulté à estimer cette proportion car les professionnels s'efforcent de trouver un autre prélèvement tumoral pour refaire le test face à un résultat non interprétable. En cas de résultats non concluants, les parties prenantes sollicitées indiquent qu'il faut refaire le test sur un autre prélèvement.

➔ Communication des résultats

Selon les parties prenantes sollicitées, les résultats rendus par les professionnels doivent indiquer, la présence ou l'absence de la ou des mutations, le type de mutation recherché ainsi que les données liées au prélèvement et aux techniques. Le CNPath a précisé que la mutation identifiée doit être décrite selon la nomenclature HGVS au niveau d'un exon spécifique pour un gène spécifique. Selon le GFCO, un résultat négatif pour la recherche de mutation devra être interprété en tenant compte de la cellularité tumorale du fragment tissulaire analysé.

Selon le CNPath, le rendu des résultats doit idéalement être effectué sur un temps court de l'ordre de 48 h afin de permettre la discussion du dossier en RCP et d'initier sans retard la thérapie ciblée si celle-ci est indiquée.

3.4.3.4. Assurance Qualité

La démarche d'assurance qualité est soulignée par les deux parties prenantes comme un élément prépondérant dans la réalisation des examens de génétique somatique ; elle se traduit par l'accréditation des laboratoires par le COFRAC selon la norme ISO 15189.

Dans ce cadre, le CNPath rappelle que des règles strictes doivent être établies conformément aux bonnes pratiques de laboratoire sur l'ensemble du processus d'analyse à savoir l'organisation des locaux, le matériel et ses modalités d'utilisation, le personnel, les procédures techniques (comprenant la validation de la méthode décrite dans la section 3.3.5), ainsi que la mise en place d'un contrôle de qualité, des procédures et des résultats obtenus.

Les professionnels soulignent l'importance de l'utilisation des contrôles qualité externes nationaux (e.g. AFAQAP, Gen&Tiss), et internationaux (UKNEQAS).

Conclusion

Les tests de détection des mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK et des mutations des gènes BRAF, NRAS, et KRAS sont des tests dit « compagnons » ou « théragnostiques », car ils sont associés à une thérapie ciblée, dont la mise en œuvre dépend de leurs résultats. Ils permettent en effet de détecter, dans la tumeur d'un patient, des mutations génétiques spécifiques, dont la présence éventuelle est prédictive de l'efficacité ou de la résistance au traitement selon les cas.

Suite aux avis favorables de la HAS pour le remboursement de ces quatre tests compagnons en 2014 et 2015, l'UNCAM a saisi la HAS en 2019 afin d'obtenir des compléments d'information sur les conditions de réalisation de ces tests. Les données ainsi recueillies et analysées sont les suivantes :

- ➔ **les populations cibles** des tests correspondent aux patients concernés par les indications définies dans les AMMs des thérapies ciblées associées à leurs tests compagnons ; elles sont estimées à partir des données d'activité de génétique somatique de l'INCa (2018)²⁹ :
 - recherche de mutations activatrices du gène de l'EGFR-TK dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) localement avancé ou métastasé : **22 400 patients**³⁰ ;
 - recherche de mutations du gène BRAF codon V600 dans le mélanome non résecable ou métastatique : **6 200 patients** ;
 - recherche de mutations du gène KRAS dans le cancer colorectal métastatique : **18 700 patients** ;
 - recherche de mutations du gène NRAS dans le cancer colorectal métastatique : **16 400 patients**.
- ➔ la mise en œuvre des tests implique la prescription de l'acte conformément à l'avis rendu en 2014/2015 par la HAS selon l'AMM des thérapies ciblées associées aux quatre tests compagnons. **La prescription** peut être réalisée par le médecin clinicien en charge du patient, par le médecin ACP responsable du diagnostic ou encore par un médecin de la RCP ;
- ➔ **la phase pré-analytique**³¹ du test est réalisée par un médecin ACP. Elle comprend des étapes de prélèvement, de préparation, de qualification et de sélection de l'échantillon :
 - la préparation de l'échantillon s'effectue soit par la méthode de fixation en formol suivie d'une inclusion en paraffine (acte N005), soit par la cryoconservation (acte N006) ; une préparation adéquate de l'échantillon permettra de garantir l'intégrité de l'ADN à analyser ;
 - la qualification de l'échantillon correspondant à un contrôle macroscopique et microscopique de l'échantillon. Elle permet notamment d'identifier la présence d'éventuels facteurs confondants (e.g. nécrose, cellule stromale) et surtout de déterminer la cellularité tumorale de l'échantillon dont la teneur doit être de l'ordre de 20 à 25 %, toujours supérieure à la limite de détection de la technique d'analyse utilisée ;
- ➔ **la phase analytique** du test comprend une étape d'extraction de l'ADN de l'échantillon fixé et la recherche de mutations par technique moléculaire ; elle est réalisée par le biologiste médical ou le médecin ACP, formés en biologie moléculaire :

²⁹ Une analyse des données plus récente n'était pas disponible lors de la rédaction de rapport, compte tenu de la crise COVID-19.

³⁰ Cette valeur correspondant à l'activité pour l'année 2018 fait suite à une baisse de 20% de l'activité par rapport à 2017.

³¹ https://www.has-sante.fr/jcms/p_3080503/fr/actes-de-preparation-qualification-et-selection-d-un-echantillon-tissulaire-ou-cellulaire-pour-analyse-de-genetique-somatique-des-cancers

- l'extraction des acides nucléiques du tissu fixé (FFPE ou cryoconservé) comprend un processus de lyse cellulaire, d'élimination des protéines puis de purification/concentration de l'ADN à analyser ;
 - Les techniques de biologie moléculaire utilisées pour la réalisation de ces tests reposent essentiellement sur la PCR ciblée (la technique *High Resolution Melting*, la Snapshot, et la technique Taqman®) et sur le séquençage des acides nucléiques (méthode de Sanger, pyroséquençage) ; il n'existe pas de technique de référence ;
- ➔ **la phase post-analytique** comprend l'interprétation, la validation et la communication des résultats *via* l'envoi du CR-GM. Elle est réalisée par le biologiste médical ou le médecin ACP, formés en biologie moléculaire. Une fois la communication des résultats faite auprès des médecins prescripteurs, le médecin clinicien communique au patient les résultats du test génétique et le choix thérapeutique qui en découle ;
- ➔ conformément à la loi en vigueur, les laboratoires de biologie moléculaire doivent être accrédités par le **Comité français d'accréditation (COFRAC) selon les critères de la norme ISO 15189** correspondant à la norme de qualité internationale de référence pour les laboratoires de biologie médicale. Chaque technique d'analyse utilisée par le laboratoire doit faire l'objet d'un **dossier de validation de la méthode** reposant essentiellement sur :
- l'évaluation des performances de la technique reposant principalement sur l'estimation de la sensibilité analytique (limite de détection), de la répétabilité et la de reproductibilité de la méthode ; la robustesse peut également être évaluée pour certaine technique.
 - la maîtrise des risques à chaque étape du processus analytique du patient (prélèvement de l'échantillon) jusqu'à la communication des résultats d'analyse ;
- ➔ l'assurance qualité en ACP implique que tous les acteurs aient le même souci permanent de la meilleure exécution des actes à chaque étape de leur déroulement afin d'aboutir à la meilleure sécurité et à la meilleure rapidité des résultats. Adhérer à ce principe conduit à adopter à tous les niveaux des règles de bonne pratique. L'Association Française d'Assurance Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologiques (AFAQAP³²) se charge de définir des recommandations permettant un exercice optimal de la discipline. Ces recommandations sont évolutives, adaptées en fonction des progrès techniques, des connaissances médicales, de l'environnement social et législatif et constituent l'outil indispensable pour une meilleure qualité de prise en charge des actes d'anatomie et de cytologie pathologiques.

³² <https://www.afaqap.fr/lassociation/lanapath>

Table des figures et des tableaux

Table des figures

Figure 1 : Voie de signalisation de l'EGFR	10
Figure 2 : Évolution de l'activité de la recherche de la mutation activatrice de l'EGFR-TK dans le cancer du poumon (tests réalisés sur les tumeurs) depuis 2008 (source des données : Inca, 2020 (41))	19
Figure 3 : Évolution de l'activité de recherche de la mutation du gène BRAF dans le mélanome cutané depuis 2010 (source des données : Inca, 2020 (44))	20
Figure 4 : Évolution de l'activité de recherche des mutations KRAS (depuis 2007) et NRAS (depuis 2013) dans le cancer colorectal (source des données : Inca, 2020 (47))	21
Figure 5 : Évolution de l'activité de génétique somatique en France pour les quatre tests compagnons (source de données : INCa, 2020)	22
Figure 6 : Récapitulatif des acteurs et de leur rôle aux différentes étapes de réalisation du test compagnon	28

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des mutations affectant le codon V600 du gène BRAF	11
Tableau 2 : Avis rendus par la HAS pour les quatre tests compagnons en fonction de l'indication et de la thérapie ciblée associée au test	14
Tableau 3 : Indications, actes (interventions) et critères à renseigner dans le cadre de cette évaluation	16
Tableau 4 : Liste des organismes consultés	18

Table des annexes

Cf. document dédié joint (https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-09/annexes_tests_compagnons.pdf)

Annexe 1.	Avis de la HAS relatif au test de détection des mutations activatrices de l'EGFR-TK dans le cancer du poumon	4
Annexe 2.	Avis de la HAS relatif au test de détection d'une mutation BRAF dans le mélanome cutané	5
Annexe 3.	Avis de la HAS relatif au test de détection d'une mutation KRAS dans le cancer colorectal	6
Annexe 4.	Avis de la HAS relatif au test de détection d'une mutation NRAS dans le cancer colorectal	7
Annexe 5.	Stratégie de recherche bibliographique	8
Annexe 6.	Références bibliographiques sélectionnées	10
Annexe 7.	Modèle de compte-rendu de génétique moléculaire (CR-GM) pour la recherche de mutations somatiques mis à disposition sur le site de l'INCa	11
Annexe 8.	Formulaire COFRAC SH FORM 43 : vérification / validation d'une méthode de biologie médicale	13
Annexe 9.	Réponses des parties prenantes	21

Références bibliographiques

1. Haute Autorité de Santé. Evaluation des actes de préparation, qualification et sélection d'un échantillon tissulaire ou cellulaire pour analyse de génétique somatique des cancers. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2019. https://has-sante.fr/jcms/p_3080503/fr/evaluation-des-actes-de-preparation-et-de-qualification-d-un-echantillon-tissulaire-ou-cellulaire-en-anatomocytopathologie-pour-l-analyse-en-genetique-somatique-des-cancers-feuille-de-route?portal=p_3058934
2. Haute Autorité de Santé. Définition des conditions de réalisation des tests de détection des mutations activatrices du domaine tyrosine kinase du récepteur EGFR et des mutations BRAF, NRAS, KRAS. Note de cadrage. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2020. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3194755/fr/definition-des-conditions-de-realisation-des-tests-de-detection-des-mutations-activatrices-du-domaine-tyrosine-kinase-du-recepteur-egfr-et-des-mutations-braf-nras-kras-note-de-cadrage
3. Ministère des affaires sociales et de la santé, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. Plan cancer 2009-2013. Rapport final au Président de la République, juin 2013. Paris: Ministère des affaires sociales et de la santé; 2013. <https://www.vie-publique.fr/sites/default/files/rapport/pdf/134000559.pdf>
4. Jackson SE, Chester JD. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer* 2015;137(2):262-6. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28940>
5. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 2018;12(1):3-20. <http://dx.doi.org/10.1002/1878-0261.12155>
6. Roskoski R. Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol Res* 2018;135:239-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.013>
7. Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C, Denis MG. Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E. *Mol Cell Probes* 2004;18(5):349-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2004.05.004>
8. Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C, Zhang L, Fagin JA. Conditional BRAF^{V600E} expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res* 2005;65(6):2465-73. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-3314>
9. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949-54. <http://dx.doi.org/10.1038/nature00766>
10. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, *et al.* BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62(23):6997-7000.
11. Andrulelis M, Lehnert N, Capper D, Penzel R, Heining C, Huellein J, *et al.* Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma. *Cancer Discov* 2013;3(8):862-9. <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-13-0014>
12. Dietrich S, Glimm H, Andrulelis M, von Kalle C, Ho AD, Zenz T. BRAF inhibition in refractory hairy-cell leukemia [letter]. *N Engl J Med* 2012;366(21):2038-40. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMc1202124>
13. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 2005;36(5):486-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2005.03.015>
14. Lovly CM, Brown Dahlman K, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, *et al.* Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One* 2012;7(4):e35309. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035309>
15. Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2006;119(8):1858-62. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.22071>
16. Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin Cancer Res* 2004;10(5):1753-7. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-1169-3>
17. Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, *et al.* BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):6133-8. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-04-2670>
18. Trovisco V, Soares P, Soares R, Magalhães J, Sá-Couto P, Sobrinho-Simões M. A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36(6):694-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2005.04.011>
19. Reifemberger J, Knobbe CB, Sterzinger AA, Blaschke B, Schulte KW, Ruzicka T, *et al.* Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int J Cancer* 2004;109(3):377-84. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.11722>
20. Xiao HD, Yamaguchi H, Dias-Santagata D, Kuboki Y, Akhavanfard S, Hatori T, *et al.* Molecular characteristics and biological behaviours of the oncocytic and pancreatobiliary subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasms. *J Pathol* 2011;224(4):508-16. <http://dx.doi.org/10.1002/path.2875>
21. Shah R, Lester JF. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: a clash of the generations. *Clin Lung Cancer* 2020;21(3):e216-e28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2019.12.003>
22. Ohhara Y, Fukuda N, Takeuchi S, Honma R, Shimizu Y, Kinoshita I, *et al.* Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2016;8(9):642-55. <http://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v8.i9.642>
23. Institut national du cancer. Comment se déroule un test moléculaire ? [En ligne]. Boulogne-Billancourt: INCa; 2015. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Therapies-ciblees-et-immunotherapie>

24. Negura L, Carasevici E, Huma AM, Artenie V. Méthodologie actuelle de la biologie moléculaire pour la détection des mutations. *Anal Sti Univ Sect Genet Biol Mol* 2006;7:13-20.

25. van Krieken JH, Rouleau E, Ligtenberg MJ, Normanno N, Patterson SD, Jung A. RAS testing in metastatic colorectal cancer: advances in Europe. *Virchows Arch* 2016;468(4):383-96.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00428-015-1876-7>

26. Institut national du cancer. Les tests de génétique somatique [En ligne]. Boulogne-Billancourt: INCa; 2017.
<http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/Les-tests-de-genetique-somatique/Les-tests-de-genetique-somatique>

27. Haute Autorité de Santé. Avis n° 2019.0067/AC/SEAP du 18 décembre 2019 du collège de la HAS relatif à l'inscription sur la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale de l'acte de sélection et préparation d'un échantillon tissulaire fixé et inclus en paraffine pour analyse de génétique somatique des cancers. Saint-Denis La Plaine: HAS; 2019.
https://www.has-sante.fr/jcms/p_3143846/fr/avis-n-2019-0067/ac/seap-du-18-decembre-2019-du-college-de-la-has-relatif-a-l-inscription-sur-la-liste-des-actes-et-prestations-mentionnee-a-l-article-l-162-1-7-du-code-de-la-securite-sociale-de-l-acte-de-selection-et-preparation-d-un-echantillon-tissulaire-fixe-et-inclus-en-paraffine-pour-analyse-de-genetique-somatique-des-cancers

28. Institut national du cancer. Bonnes pratiques pour la recherche à visée théranostique de mutations somatiques dans les tumeurs solides. Boulogne-Billancourt: INCa; 2010.
<https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Bonnes-pratiques-pour-la-recherche-a-visee-theranostique-de-mutations-somatiques-dans-les-tumeurs-solides>

29. Institut national du cancer. Validation de méthodes pour la recherche de mutations en génétique somatique. Boulogne-Billancourt: INCa; 2014.
<https://www.e-cancer.fr/content/download/86001/874800/file/Validation-de-methode-en-genetique-Somatique.pdf>

30. Onco-Occitanie réseau régional de cancérologie. Référentiel de biologie moléculaire 2020. Référentiel régional. Toulouse: Onco-Occitanie; 2020.
<https://www.onco-occitanie.fr/oo/download/media/file/419>

31. Agence du numérique en santé, Institut national du cancer. Compte rendu de génétique moléculaire (CANCER-CR-GM V2021.01). Spécifications fonctionnelles. Cadre d'interopérabilité des SIS - Couche Contenus. Référentiels. Version en concertation, 12/05/2021. Paris: ANS; 2021.
https://esante.gouv.fr/sites/default/files/media_entity/documents/CI-SIS_CR-GM_SFD_2021.01_20210512.pdf

32. Comité français d'accréditation. Exigences pour l'accréditation selon les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870. SH REF 02 - Révision 06. Paris: COFRAC; 2019.
<https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-02>

33. Comité français d'accréditation. Expression et évaluation des portées d'accréditation. SH REF 08 - Révision 06. Paris: COFRAC; 2019.
<https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-REF-08>

34. Comité français d'accréditation. Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Document SH GTA 04. Révision 01. Paris: COFRAC; 2015.
<https://tools.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-04>

35. American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, Sepulveda AR, Hamilton SR, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 2017;147(3):221-60.
<http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/aqw209>

36. Blons H, Laurent-Puig P. Aspect technique de la détermination du statut KRAS dans le cancer colorectal et mise en place en France. Point de vue du biologiste. *Bull Cancer* 2009;96(N° Spec):S47-56.
<http://dx.doi.org/10.1684/bdc.2009.0996>

37. Société de réanimation de langue française, Uhel F, Zafrani L. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Méd Intensive Réa* 2019;28(6):464-72.
<http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3166/rea-2019-0119>

38. Agence européenne des médicaments. IRESSA 250 mg, comprimés pelliculés. Résumé des caractéristiques du produit. Londres: AEM; 2009.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/iressa-epar-product-information_fr.pdf

39. Agence européenne des médicaments. Tarceva 25 mg comprimés pelliculés. Tarceva 100 mg comprimés pelliculés. Tarceva 150 mg comprimés pelliculés. Résumé des caractéristiques du produit. Londres: AEM; 2005.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tarceva-epar-product-information_fr.pdf

40. Agence européenne des médicaments. GIOTRIF 20 mg, comprimés pelliculés. GIOTRIF 30 mg, comprimés pelliculés. GIOTRIF 40 mg, comprimés pelliculés. GIOTRIF 50 mg, comprimés pelliculés. Résumé des caractéristiques du produit. Londres: AEM; 2013.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/giotrif-epar-product-information_fr.pdf

41. Institut national du cancer. Cancer du poumon - les tests de génétique somatique [En ligne]. Boulogne-Billancourt: INCa; 2020.
<http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/Les-tests-de-genetique-somatique/Cancer-du-poumon-les-tests-de-genetique-somatique>

42. Agence européenne des médicaments. Tafinlar 50 mg gélules. Tafinlar 75 mg gélules. Résumé des caractéristiques du produit. Londres: AEM; 2013.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tafinlar-epar-product-information_fr.pdf

43. Agence européenne des médicaments. Zelboraf 240 mg comprimés pelliculés. Résumé des caractéristiques du produit. Londres: AEM; 2012.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zelboraf-epar-product-information_fr.pdf

44. Institut national du cancer. Mélanome - les tests de génétique somatique [En ligne]. Boulogne-Billancourt: INCa; 2020.
<http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/Les-tests-de-genetique-somatique/Melanome-les-tests-de-genetique-somatique>

45. Agence européenne des médicaments. Vectibix 20 mg/mL solution à diluer pour perfusion. Résumé des caractéristiques du produit. Londres: AEM; 2007.

https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/vectibix-epar-product-information_fr.pdf

46. Agence européenne des médicaments. Erbitux 5 mg/mL solution pour perfusion. Résumé des caractéristiques du produit. Londres: AEM; 2004.

https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_fr.pdf

47. Institut national du cancer. Cancer colorectal - les tests de génétique somatique [En ligne]. Boulogne-Billancourt: INCa; 2020.

<http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/Les-tests-de-genetique-somatique/Cancer-colorectal-les-tests-de-genetique-somatique>

48. Institut national du cancer. Evolution de l'activité de génétique somatique dans le cancer du poumon : tests

réalisés sur l'ADN circulant [En ligne]. Boulogne-Billancourt: INCa; 2020.

<https://lesdonnees.e-cancer.fr/Fiches-Indicateurs/Prise-en-charge/Plateformes/Evolution-de-l-activite-de-genetique-somatique-dans-le-cancer-du-poumon-tests-realises-sur-l-ADN-circulant>

49. Institut national du cancer. Les tests de génétique moléculaire pour l'accès aux thérapies ciblées en France en 2011. Boulogne-Billancourt: INCa; 2011.

50. Institut national du cancer. Le programme d'assurance qualité des plateformes [En ligne]. Boulogne-Billancourt: INCa; 2018.

<https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-therapies-ciblees/Les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers/Le-programme-d-assurance-qualite-des-plateformes>

Participants

Les organismes professionnels ont été sollicités comme parties prenantes afin de recueillir leur point de vue à titre collectif sur les conditions de réalisation des quatre tests compagnons faisant l'objet de ce rapport.

- Conseil national professionnel des médecins spécialistes en anatomie et cytologie pathologiques (CNPath)
- Groupe francophone de cyto-génomique oncologique (GFCO)

Remerciements

La HAS tient à remercier l'ensemble des participants cités ci-dessus.

Abréviations et acronymes

ACP	Anatomie et cytologie pathologiques
ADN	Acide désoxyribonucéique
ADNct	ADN tumoral circulant
AFAQAP	Association française d'assurance qualité en anatomie et cytologie pathologiques
ASA	Amélioration du service attendu
ATP	Adénosine triphosphate
CBNPC	Cancer bronchique non à petites cellules
CCD	Charge coupled device
CE-IVD	Marquage CE pour les dispositifs de diagnostic in vitro
CIQ	Contrôle qualité interne
CLCC	Centre de lutte contre le cancer
CNPath	Conseil national professionnel des pathologistes
CH	Centre hospitalier
CHU	Centre hospitalier universitaire
COFRAC	Comité français d'accréditation
CR-GM	compte-rendu de génétique moléculaire
DCI	Dénomination commune internationale
DM-DIV	Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro
DMP	Dossier médical partagé
ddNTP	Didéoxynucléotide triphosphate
ddATP	Didésoxyadénosine triphosphate
ddCTP	Didésoxycytidine triphosphate
ddGTP	Didésoxyguanosine triphosphate
ddTTP	Didésoxythymidine triphosphate
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
EEQ	Évaluations externes de la qualité
EGF	Epidermal Growth Factor ou Facteur de croissance épidermique
EGFR-TK	Domaine tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor)
ESPIC	Établissement de santé privé d'intérêt collectif
FFPE	Fixé au formol et inclus en paraffine (tissu)
Gen&Tiss	Organisme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) des examens de génétique moléculaire sur tissus tumoraux
GFCO	Groupe francophone de cyto-génomique oncologique
HAS	Haute Autorité de santé
HRM	La technique High Resolution Melting

HGVS	Human Genome Variation Society
ISH	Hybridation in situ
INCa	Institut national du cancer
ISO	Organisation internationale de normalisation
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase
LC	Liste complémentaire (d'actes de biologie médicale et d'anatomie et cytologie pathologiques)
LOD	Limite ou seuil de détection
NGS	Next Generation Sequencing (séquençage de nouvelle génération)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
RIHN	Référentiel des actes innovants hors nomenclature de biologie et d'anatomopathologie
UKNEQAS	United Kingdom International External Quality Assessment Services
UNCAM	Union Nationale des Caisse d'assurance maladie
SA	Service attendu
SEAP	Service Evaluation des Actes Professionnels
Taqman®	PCR quantitative par détection en temps réel de la fluorescence

Retrouvez tous nos travaux sur
www.has-sante.fr

